

**Histotopochemie der Glykosidasen
Leucin-Aminopeptidase und Carboanhydrase
in Korrelation zur endokrinen Funktion
im menschlichen Eierstock**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

einer

Hohen Medizinischen Fakultät
der

Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

vorgelegt von

Gisela Hanko

aus Bielefeld

1964

8021



Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. R o e m e r

Histotopochemie der Glykosidasen
Leucin-Aminopeptidase und Carboanhydrase
in Korrelation zur endokrinen Funktion
im menschlichen Eierstock

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gisela Hanko
aus Bielefeld

1964

D e k a n :

Prof.Dr. H. H a r m s

1.Berichterstatter: Dozent Dr.med. P. K ö n i g

2.Berichterstatter: Prof.Dr.med. H. R o e m e r

Herrn Dozent Dr. K ö n i g danke ich für die
Überlassung des Themas und für die Hilfe bei
der Durchführung der Arbeit.

I N H A L T

	Seite
Einleitung	1
I. Die Glykosidasen	5
1. β -Glucuronidase	
Biochemie	6
Histochemie	9
Eigene Methodik	17
Eigene Befunde	20
2. β -Galactosidase	
Biochemie	24
Histochemie	26
Eigene Methodik	29
Eigene Befunde	30
II. Leucin-Amino-peptidase	
Biochemie	33
Histochemie	36
Eigene Methodik	42
Eigene Befunde	43
III. Carboanhydrase	
Biochemie	46
Histochemie	49
Eigene Methodik	52
Eigene Befunde	55
IV. Vergleich der Befunde der Literatur mit den eigenen Ergebnissen	58
V. Korrelation von Glykosidasen, Leucin- Amino-peptidase und Carboanhydrase zu den Sexualhormonen	66
Zusammenfassung	71
Tabellen	73
Literaturverzeichnis	75

Einleitung

Die Fermente oder Enzyme beeinflussen als Biokatalysatoren die Reaktionsgeschwindigkeit der Synthese oder Spaltung eines Stoffes, ohne im Endprodukt zu erscheinen. Im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren besteht eine Substrat- und Wirkungsspezifität.

Die Fermente sind Eiweißkörper. Die Eiweißnatur wurde erstmalig durch die Kristallisation der Urease durch SUMNER (1926) festgestellt. Die meisten Enzyme sind Proteide, die aus einem niedermolekularen Coferment und einem Eiweißanteil, dem Apoferment bestehen. Einige enthalten anorganische Komplemente, - die Cytochrome Eisen, die Carboanhydrase Zink (RICHTERICH 1958). WILLSTÄTTER (1934) teilte die Fermente in Lyo- und Desmoenzyme ein. Die Lyoenzyme liegen in der Zelle in freier Lösung vor und sind mit Lösungsmitteln extrahierbar. Die Desmoenzyme sind an das Protoplasma gebunden und nur durch chemische oder enzymatische Eingriffe abzulösen.

Die Enzymaktivität und das "Enzymprofil" (RICHTERICH 1958) einer Zelle sind von ihrer Funktion im Stoffwechsel abhängig. Die Regulierung der Fermentaktivität erfolgt wahrscheinlich durch Hormone und durch das vegetative Nervensystem (RICHTERICH 1958). Die Hormonwirkung besteht in einer Sofortreaktion, die die Enzymaktivität über Milieufaktoren beeinflusst, z.B. durch Änderung der Zellwandpermeabilität, sowie in einer Spätwirkung, wobei die Fermentkonzentration durch die veränderte Stoffwechsellage beeinflusst wird.

Durch histochemische Reaktionen können die Fermente im Gewebe lokalisiert werden. Eine vollständige Erfassung der Aktivität der Enzyme der lebenden Zelle ist nicht möglich, da durch die histochemischen Nachweismethoden Aktivitätsverluste nicht zu vermeiden sind.

Der histochemische Enzymnachweis beruht auf der Spaltung eines für das betreffende Ferment weitgehend spezifischen Substrates durch die im Gewebe vorhandenen Enzyme eines histologischen Schnittpräparates in einer Inkubationslösung. An den fermentaktiven Stellen des Präparates entstehen durch enzymatische Katalyse des Substrates Spaltprodukte, die als Niederschlag sichtbar sind oder durch Kupplung mit einem Farbstoff bzw. durch Metallsalzpräzipitation visualisiert werden.

Das Substrat soll wasserlöslich sein und gut in das Gewebe diffundieren. Durch hohe Konzentrationen in der Inkubationslösung kann die Enzymaktivität gehemmt werden. Außerdem ist eine rasche Spaltung des Substrates wichtig, da lange Inkubationszeiten und hohe Temperaturen eine Diffusion der Spaltprodukte in die Umgebung ermöglichen. Das Reaktionsprodukt soll in Wasser und Lipiden unlöslich sein. Von dem Kupplungsreagenz bzw. dem Metallsalz wird eine rasche Reaktion mit dem Spaltprodukt gefordert; es darf die Enzymreaktion nicht beeinträchtigen (PEARSE 1960).

Die Spezifität des Fermentnachweises kann durch Hemmung der Reaktion geprüft werden, indem enzymespezifische Inhibitoren bei der Inkubation zugesetzt werden.

Die Vorbehandlung des Gewebes ist für die Aktivitätserhaltung der Enzyme und die Lokalisation der histochemischen Reaktion von Bedeutung. Die Inkubation unfixierter Präparate ergibt bei längeren Bebrütungszeiten eine Diffusion der Enzyme - besonders der Lyokomponente - in die Inkubationslösung. Durch die diffundierten Fermente entstehen in der Lösung Spaltprodukte, die sich auf den Präparaten ablagern und das Ergebnis verfälschen (PEARSE 1960).

Zunächst wurden in der Fermenthistochemie zur Fixierung der Gewebe Alkohol und Azeton benutzt und die Gewebeblöcke anschließend zum Schneiden in Paraffin eingebettet. Empirisch war eine geringe Beeinflussung der reaktiven Gruppen der Enzyme durch die Vorbehandlung festgestellt worden.

Für den Nachweis der Sulfatase und β -Glucuronidase war diese Vorbehandlung nicht brauchbar, da die bei Paraffineinbettung notwendige Erhitzung die Fermente zerstörte. SELIGMAN et al. (1951) benutzten zur Vorbehandlung der Gewebeblöcke Formalin, das durch Polymerisation das Eiweiß fixiert und fertigten an Stelle von Paraffinschnitten Gefrierschnitte an. Nach vierstündiger Formalinfixierung war die Aktivität der β -Glucuronidase um 15 % gemindert, während sie nach Azetonbehandlung und Paraffineinbettung nicht mehr nachzuweisen war. Die Fixierung der Gewebe soll die natürliche Fermentlokalisation erhalten und die Aktivität möglichst wenig vermindern.

In den vorliegenden Untersuchungen werden vier Fermente, die β -Glucuronidase, die β -Galactosidase, die Leucin-Amino-peptidase und die Carboanhydrase durch histochemische Reaktionen in gesunden menschlichen Ovarien nachgewiesen. Das Material konnte bei Operationen entnommen werden. Die β -Glucuronidase bewirkt Spaltung und Synthese von Glucuronidbindungen. Das Enzym steht wahrscheinlich in enger Beziehung zum Oestrogenstoffwechsel. Durch die β -Galactosidase wird ein Ferment des Kohlenhydratstoffwechsels nachgewiesen. Die Leucin-Amino-peptidase ist als einziges Ferment des Eiweißstoffwechsels durch histochemische Reaktionen zu erfassen. Die Carboanhydrase ist für die Erhaltung des Ionengleichgewichtes von Bedeutung.

In der Literatur wird die histochemische Lokalisation der Leucin-Amino-peptidase im menschlichen Ovarium von zwei Autoren beschrieben (FUHRMANN 1959; NACHLAS et al. 1960). β -Glucuronidase, β -Galactosidase und Carboanhydrase werden erstmalig histochemisch im menschlichen Eierstock lokalisiert.

Der Nachweis der Enzyme wurde an Ovarien durchgeführt, da hier aus der Morphologie des Follikelapparates ein Rückschluß auf die Funktion und die endokrinologische Situation bezüglich der weiblichen Sexualhormone erfolgen kann. Die Lokalisation der Fermente ermöglicht hier einen Einblick in das Enzymmuster der endokrinaktiven Strukturen.

Im Vergleich von Morphologie und Enzymlokalisation im menschlichen Ovarium bestimmter Funktionszustände wird versucht, Korrelationen zwischen den nachgewiesenen Fermenten und der Steroidhormon-Inkretion aufzuweisen.

I. Die Glykosidasen

=====

Zu den Glykosidasen, auch Carbohydrasen genannt, gehören Enzyme, die glykosidische -halbacetalartige- Bindungen spalten. Sie bilden eine Untergruppe der Hydrolasen. Ihre Substrate sind Kohlenhydrate wie Poly- und Oligosaccharide und auch Kohlenhydrat-Alkohol- und -Phenolverbindungen. Ein weiteres Substrat sind Heteroside, - Glykoside mit einem Aglykon, also einem nicht zuckerartigen Paarling, während das Glykon eine spezifische Ringform aufweist (Furanose- oder Pyranoseform).

Die Glykosidasen werden in zwei Hauptgruppen unterteilt:

1. Die Oligosaccharidasen = Oligosidasen, die Kohlenhydratketten aus bis zu 6 Monosacchariden spalten.
2. Die Polysaccharidasen = Polysidasen, zu denen die Amylase (Diastase) und die Hyaluronidase gehören.

Die Unterteilung der Oligosidasen erfolgt nach der Theorie von WEIDENHAGEN (1940), der ein spezifisches Ferment für jeden Typ der glykosidischen Bindung forderte.

Die Oligosaccharidasen hydrolysieren nicht nur Substrate, sondern können sie außer auf Wasser auch auf andere Akzeptoren wie Zucker oder Alkohol übertragen. Sie wirken also als Transglykosilasen. HOFFMANN-OSTENHOF (1954) teilt folgendes Schema des Reaktionsablaufes mit:



1. β -Glucuronidase

Biochemie der β -Glucuronidase:

Die β -Glucuronidase spaltet β -Glucuronide, d.h. die β -glykosidischen Bindungen der Glucuronsäure mit phenolischen Substanzen. Sie hydrolysiert gepaarte Glucuronsäuren, wie aromatische und hydroaromatische Heteroside, wobei das Aglykon z.B. Phenol, Naphthol, Borneol, Phenolphthalein oder 8-Hydroxychinolin sein kann. Von den körpereigenen Stoffen werden Glucuronide des Oestrogen und der Corticosteroide gespalten (AMMON).

Das Ferment wird in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren gefunden.

Die biochemischen Eigenschaften wurden an Fermentaufbereitungen aus verschiedenen Organen untersucht (Rindermilz, Eingeweidesack der Meerschnecke, Schafpansen, Präputialdrüse der Ratte). Das pH-Optimum des tierischen und pflanzlichen Ferments liegt im sauren Bereich bei pH 4,0 - pH 5,0.

In einem Organ scheint nicht jeweils nur eine Glucuronidase nachweisbar zu sein. MILLS et al. (1953a) fanden bei Fermentaufbereitungen aus der Milz drei Fraktionen mit verschiedenem pH-Optimum und unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeit.

Eine kompetitive Hemmung der Hydrolyse wurde durch organische Säuren wie Zitronensäure (FISHMAN 1950), Zuckersäure (KARUNAIRATNAM et al.) und Ascorbinsäure (FRIEDENFELD und BECKER) hervorgerufen. LEVY (1952) zeigte, daß das Saccharo-1,4-Lacton ein stärkerer Inhibitor ist als das Saccharat. Durch Substitution der verschiedenen enzymspezifischen Gruppen an diesem Inhibitor können aus einem Gemisch von Oligosidasen die einzelnen Fermente getrennt werden. Die β -Glucuronidase wird wie viele andere Fermente, durch Schwermetallionen gehemmt, besonders durch Kupfer-, Silber- und Quecksilberionen. Dagegen bleibt das Ferment durch Anionen und Enzymgifte wie Fluorid und Cyanid unbeeinflusst (FERNLEY).

Als Protektor des Enzyms wirkt Eiweiß, das bei stärker verdünnten Lösungen für die volle Aktivität nötig ist (LEVY et al. 1958). BERNFELD et.al. wiesen an gereinigter Milz-glucuronidase eine Aktivierung durch DNS (=Desoxyribonucleinsäure) nach.

Die Bedeutung und Funktion der β -Glucuronidase im Stoffwechsel ist nicht eindeutig geklärt. Sicher ist sie für die Entgiftungsvorgänge in der Leber wichtig. Nach Fütterung von Hunden mit Borneol und Mäusen mit Menthol wird ein Aktivitätsanstieg beobachtet (FISHMAN 1940). Es handelt sich um körperfremde Substanzen, die als Glucuronsäureverbindungen ausgeschieden werden. Wird die Fermentkonzentration durch Zufuhr eines Stoffes erhöht, spricht man von "induzierter Enzymsynthese". Die Hydrolyse von Steroidglucuroniden aus dem Urin (17-Ketosteriod, Pregnandiol) durch das Ferment wurde von HUDSON et al. nachgewiesen.

Untersuchungen über den Einfluß von Hormonen auf das Enzym veranlaßten FISHMAN (1947a), die Bildung des Oestrogenglucuronid nicht als einfache Abbaustufe sondern als "metabolic conjugation" zu werten. Die Bildung des Oestrogenglucuronid ist für die Wirkung am Gewebe wesentlich. Bei Mäusen wird die Glucuronidase-Aktivität durch oestrogene Substanzen in Uterus und Vagina, dagegen nicht in Leber, Niere und Milz, erhöht. Ein Abfall der Enzymkonzentration im Uterus wird bei Mäusen nach Ovariectomie gefunden. Durch Oestrogengaben wird wieder der Normalwert erzielt. (HOPKINS et al.) Auch an der Brustdrüse der Ratte sind die Proliferationsprozesse unter Oestrogen von einem β -Glucuronidase Anstieg begleitet (KNOBIL).

In den primären und sekundären Geschlechtsorganen des Menschen ist eine hohe Glucuronidase-Aktivität nachweisbar (FISHMAN 1955), die vom Sexualhormonspiegel abhängige Schwankungen zeigt. Die Enzymkonzentration im menschlichen Endometrium steigt bis zur Ovulation und fällt dann bis zur Menstruation ab (ODELL et al. 1950). In der Schwangerschaft ist die Aktivität im Scheidensekret und im Blutplasma erhöht. Die Plasma-Glucuronidase ist bei präeklampsie-

schen Zuständen vermehrt, dagegen nicht bei hypertensiver Toxämie (ODELL 1948; PASETTO et al. 1956; FISHMAN et al. 1950). Post partum fällt die Enzymkonzentration rasch ab. Durch Zufuhr von Stilboestrol kann ein hohes Niveau erhalten werden (PASETTO).

Bei Frauen in der Menopause werden hohe Glucuronidase-Titer im Vaginalsekret gefunden, die häufig doppelt so hoch sind wie bei regelmäßig Menstruierenden (FISHMAN et al. 1950). Nach Kastration durch Bestrahlung oder Ovariectomie steigt der Enzymspiegel ebenfalls an. In einem Falle konnte der Anstieg nach Kastration durch Gaben von Stilboestrol wieder auf die Normalwerte gesenkt werden. Diese Untersuchungen scheinen darauf hinzuweisen, daß eine regulatorische Wirkung der Oestrogene auf die β -Glucuronidase vorliegt.

Die von FISHMAN aufgestellte These, die Oestrogen-Glucuronid Bildung durch β -Glucuronidase als "metabolic conjugation" zu deuten, ist umstritten. LEVY et al. (1948) schreiben dem Ferment nur eine hydrolytische Wirkung zu, da die Hemmung der Glucuronidase durch Zuckersäure die Glucuronidsynthese in Schnitten der Mäuseleber nicht beeinflusste.

Die β -Glucuronidase wird vermehrt in wachsendem Gewebe gefunden. Bei jungen Mäusen ist der Ferment Spiegel gegenüber ausgewachsenen Tieren erhöht (KERR et al. 1949). Untersuchungen der Rattenleber ergeben niedrige Werte bei neugeborenen Tieren, die bis zum 25. bis 30. Tag ansteigen (MILLS et al. 1953b). BILLETT (1957) untersuchte Embryonen der Kröte in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Er fand keine erhöhte Fermentaktivität und sah deshalb keinen Zusammenhang zwischen β -Glucuronidase-Aktivität und Zellproliferation.

Für eine Beteiligung des Fermentes an der Gewebeproliferation spricht die erhöhte Aktivität in Neoplasmen. Gegenüber benignen Tumoren liegt in Malignomen eine 6-26fach erhöhte Aktivität vor (FISHMAN, ANLYAN 1947). Als Ursachen dieser Aktivitätssteigerung werden die Anwesenheit aktivierender Substanzen oder das Fehlen eines Inhibitors diskutiert.

Die Fermentaktivität liegt in Karzinomen in den Turmozellen, besonders an den aktiv wachsenden Stellen, nicht im Bindegewebe (CAMPBELL 1949). Untersucht wurden Karzinome von Mamma, Oesophagus, Magen, Colon, Pankreas, Schilddrüse, Blase und Niere, von Zervix, Uterus und Ovar sowie von der Haut (FISHMAN, ANLYAN; BRAUN-FALCO 1956b; WACHSTEIN 1962). Beim Zervix-Karzinom ist die Glucuronidase-Aktivität lokal höher als in normalem Gewebe. Das Vaginalsekret zeigt einen deutlichen Fermentanstieg, der von der Malignität des Tumors abhängig zu sein scheint (PASETTO; HATZMICHAEL). Beim Karzinom der Blase ist der Glucuronidase-Nachweis im Urin für die Diagnostik von Bedeutung (BOYLAND).

In Gegenwart eines Glucuronsäureakzeptors z.B. Glyzerin oder Propylenglykoll wird das Phenolphthalein schneller aus der Glucuronidverbindung freigesetzt. Dies zeigt, daß das Ferment auch als Transferase wirkt (FISHMAN, GREEN; NAYYAR, GLICK 1956).

Außerdem ist das Ferment mit dem Stoffwechsel der Mucoide und Mucoproteide und auch mit dem der Hyaluronsäure verknüpft. Beim Hyaluronsäureabbau spaltet es das N-Acetylglucosamin-Glucuronid (LINKER et al.).

Histochemie

Die Lokalisation der β -Glucuronidase im Gewebe hat durch die Korrelation des Fermentes zu den Sexualhormonen und durch die beobachtete hohe Aktivität in Neoplasmen besonderes Interesse hervorgerufen.

Die ersten histochemischen Methoden zum β -Glucuronidase Nachweis wurden von FRIEDENWALD und BECKER (1948) ausgearbeitet. Die Autoren benutzten das biosynthetisch gewonnene Glucuronid des 1-o-Hydroxyphenylazo-2-naphthol als Substrat, das nach der fermentativen Spaltung als wasserunlöslicher Azofarbstoff - als roter Niederschlag - an den enzymhaltigen Stellen zu erkennen war.

Diese Reaktion schien jedoch nicht spezifisch für die β -Glucuronidase zu sein. Nachuntersucher fanden keinen Unter-

schied zu Kontrollschnitten, die mit einem bekannten Inhibitor, der Zuckersäure, inkubiert wurden (CAMPBELL). Auch nach der Inaktivierung durch Hitze wurden ähnliche Ergebnisse wie in nicht vorbehandeltem Gewebe gefunden (BURTON, PEARSE).

Eine zweite Methode obiger Autoren beruht auf der Hydrolyse des 8-Hydroxychinolinglucuronid in Gegenwart eines Eisensalzes, das mit dem Reaktionsprodukt ein wasserunlösliches, grünschwarzes Chelat von Eisenhydroxychinolin ergibt. Durch die anschließende Bildung von Berliner Blau ist das Endprodukt gut sichtbar. Da Berliner Blau in Alkohol unlöslich ist, können die Präparate dehydriert werden. Es werden unfixierte Schnitte bei 37°C inkubiert.

Nachuntersucher erhielten einen feinen Niederschlag von Eisenhydroxychinolin über das ganze Präparat. Durch die Sättigung der Substratlösung mit dem Reaktionsprodukt 8-Hydroxychinolin konnte die Oberflächenfällung vermindert werden. Eine Aktivitätsminderung durch Hydroxychinolin wurde nicht beobachtet (CAMPBELL). Auch die modifizierte Methode führte zu unbefriedigenden Ergebnissen. Die Fermentlokalisation war durch die noch vorhandene Oberflächenfällung erschwert (PEARSE).

BURTON und PEARSE benutzten Gefrierschnitte, die 4-12 Stunden in kaltem Formalin fixiert waren. Außerdem wurde die Inkubationslösung mit Eisensulfat statt mit Eisenchlorid bereitet. Sie ist stabil und kann bei 4°C aufbewahrt werden. Durch diese Änderungen wird die unspezifische Fällung minimal und die Größe der einzelnen Teilchen auf die Hälfte reduziert. Die Spezifität der Methode beweist das negative Ergebnis bei Inkubation ohne Substrat und die Hemmung durch 0,001m Zuckersäure. Ganz befriedigend ist diese Reaktion auch nicht, da bei starker Vergrößerung ein grober Niederschlag vorhanden ist und durch die Vorbehandlung eine Zerstörung der feineren Plasmastrukturen erfolgt (BILLETT et al. 1956).

Weitere Verbesserungen der Methode wurden von FISHEAN und BAKER (1956a) angegeben. Sie untersuchten den Einfluß der Fixation auf die Reaktion. Die Behandlung des Gewebes mit 4%igem Formalin für 4 Stunden führte zu keiner vollständigen Fixierung, dadurch ist der Niederschlag von Berliner Blau ungleichmäßig. Der Aktivitätsverlust betrug nach 4stündiger Fixation etwa 15%, nach einer Stunde in 10%igem Formalin war keine Minderung nachweisbar. Nach 24stündiger Azetonfixierung in der Kälte war keine Reaktion mehr auszulösen. Die besten Ergebnisse erhielten die Autoren nach der Fixation in 38%igem Formalin mit 0,1 mg Chloralhydrat, wobei die Partikel des Endproduktes klein waren und eine Aktivitätsminderung nicht nachweisbar war. Optimal war die Fixation der Gewebestücke nach 17-24 Stunden bei 8°C, befriedigend waren die Ergebnisse in einer Zeitspanne von 4 Stunden bis zu 3 Tagen. Die Wirkung des Chloralhydrat am Gewebe ist nicht bekannt. Die Zellstrukturen bleiben bei dieser Fixation erhalten.

Durch eine Präinkubation bei 8°C für 17-24 Stunden wurde die Inkubationszeit bei 37°C verkürzt. Dadurch wurde die Bildung von Diffusionsartefakten und unspezifischen Fällungen vermindert. Die Vorinkubation begünstigte das Eindringen des Substrates in die Zelle, sodaß optimale Bedingungen für die Hydrolyse bei 37°C gegeben waren. Die Substratlösung enthielt neben dem 8-Hydroxychinolinglucuronid- im Azetatpuffer gelöst- 8-Hydroxychinolin und Eisensulfat. Sie blieb durch Bestäuben der Oberfläche mit pulverisiertem Gummi arabicum, einem Kolloidschutzagens, stabil und konnte im Eisschrank aufbewahrt werden. Nach der Inkubation wurden die Präparate mit Kaliumferrocyanid und Salzsäure behandelt. Die Reaktion mit dem Spaltprodukt ergab einen schwarzblauen Niederschlag von Berliner Blau.

Andere Methoden zum β -Glucuronidase-Nachweis beruhen auf der Bildung eines Azofarbstoffes.

SELIGMAN et al. (1949) benutzten als Substrat 1- bzw. 2-Naphthylglucuronid. Jedoch erfolgte die Hydrolyse zu langsam, es mußte einige Stunden bei hoher Temperatur inkubiert werden. Eine histochemische Lokalisation war nicht möglich.

Später wurde von denselben Autoren (SELIGMAN et al. 1954) eine neue Methode angegeben. Durch Einführen eines Brom-Ion wird das Naphthylglucuronid verändert, sodaß es rascher von der β -Glucuronidase hydrolysiert wird. Zunächst wurde das 6-Brom-2-Naphthyl- β -D-Glucopyruronosid biosynthetisch durch Verfütterung der Naphtholverbindung an Kaninchen gewonnen und das Glucuronid aus dem Urin extrahiert. Vor der Inkubation wurden die Präparate 10 Minuten in 10%igem, kalten Formalin fixiert. Nach der Bebrütung von 4-6 Stunden erfolgte die Kupplung des Reaktionsproduktes mit dem Diazoniumsalz Echt Blau B. (tetrazotiertes Diorthoanisidin). Blaue bis purpurne Farbstoffpartikel waren an den fermentaktiven Stellen des Gewebes zu erkennen.

Bei Nachuntersuchungen wurde eine beträchtliche Diffusion des Reaktionsproduktes gefunden (PEARSE), die auf die Verunreinigung des biosynthetisch gewonnenen Substrats durch leicht diffusible Bromine zurückzuführen war. Das synthetische, reine Substrat ermöglichte eine exakte Fermentlokalisation. Als Fehlerquelle bleibt die Lipidlöslichkeit des Bromnaphthol.

BURTON und PEARSE (1952) entwickelten eine einfache Methode zum β -Glucuronidase-Nachweis. Sie beruhte auf der Spaltung des 8-Hydroxychinolinglucuronid. Gleichzeitig erfolgte die Kupplung des Reaktionsproduktes mit dem Diazoniumsalz Echt Blau RR (4-Benzoylamino-2-5-Dimethoxyanilin). Die Inkubationszeit betrug 2-4 Stunden bei 37°C. Ein orange-roter Niederschlag war in β -Glucuronidase-haltigen Strukturen zu sehen. Für die Spezifität des Nachweises war die Hemmung der Reaktion durch 0,001 m Saccharatlösung beweisend. Die Fermentlokalisation wurde durch Diffusionsartefakte beein-

trächtig. Befriedigende Ergebnisse erhielten die Autoren in der Kaninchenmilz und in der Nebenniere des Neerschweinchens.

FISHMAN und BAKER wiesen mit der von ihnen entwickelten Methode β -Glucuronidase in Organen der Ratte nach. Sie fanden eine intensive Reaktion in den proximalen Tubuli der Nierenrinde, während das Mark und die Sammelröhren nur schwach reagierten. Die Leber zeigte eine starke Reaktion in den Parenchymzellen und den Kupfferschen Sternzellen. GOLDBARG (1960) beschrieb auch eine deutliche Aktivität der Gallenkapillaren. Eine intensive Reaktion wurde im Bronchialepithel, im Oesophagusepithel, im glandulären Epithel des Magens, im Oberflächenepithel des Dünndarms und in den Lieberkühnschen Drüsen gefunden. Die weiße Milzpulpa war intensiv gefärbt, desgleichen die Zona fasciculata und reticularis der Nebenniere, die azinären und Langerhans'schen Zellen des Pankreas und die follikulären Zellen der Schilddrüse. Von den Geschlechtsorganen zeigten die Prostata im glandulären Epithel, die Bläschendrüse, das Epithel der Vagina und das Endometrium eine starke Reaktion. Nach derselben Methode wurde eine intensive Färbung der Purkinje'schen Zellen des Kleinhirns gefunden (FISHMAN, J.S.).

Die Ergebnisse von SELIGMAN et al. mit der Azofarbstoffmethode entsprechen den Befunden von FISHMAN und BAKER. Sie beschreiben auch eine starke Reaktion der Purkinje'schen Zellen.

Der Nachweis der β -Glucuronidase in der Haut nach der Methode von SELIGMAN et al. ergab eine intensive Färbung des Stratum granulosum, der Schweißdrüsen und der Haarfollikeln (BRAUN-FALCO 1956b; MONTAGNA). Im Knochengewebe reagierten die Osteoblasten intensiv (GUBISCH et al.), auch der hyaline Knorpel und die Chondrocyten zeigten eine starke Reaktion (PUGH et al.).

In Karzinomen wurde hohe Fermentaktivität gefunden, während Sarkome nur schwach oder gar nicht reagieren (MONIS et al. 1960). In 5 Pseudomucinkarzinomen des Eierstocks wurde eine starke β -Glucuronidase Reaktion festgestellt (WACHSTEIN).

In Gebieten der Wundheilung zeigte das Epithel eine intensive Färbung (STOLK).

Eine Abhängigkeit der Fermentaktivität vom Oestrogenspiegel wurde am Rattenuterus während des Zyklus beobachtet. Im Pro-oestrus war die Reaktion schwach. Während des Oestrus reagierte das Oberflächen- und Drüsenepithel intensiv. Nach dieser Phase war keine Fermentaktivität nachweisbar (HAYASHI et al.).

Die biochemischen Ergebnisse stimmen mit den histochemischen Befunden an der Niere und Nebenniere (NAYYAR 1955), an der Leber (FISHMAN et al 1947), im Endometrium (KNOBIL) und in den Leukocyten (FISHMAN, ANLYAN) überein.

Die β -Glucuronidase wird im Cytoplasma gefunden, die Zellkerne zeigen keine Reaktion. Die Zellfraktionierung des Lebergewebes ergab, daß das Enzym an die Lysosomen des Cytoplasma gebunden ist (DE DUVE et al. 1954/55).

Die histochemischen Untersuchungen der β -Glucuronidase im Rattenovarium führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. SELIGMAN et.al. beschrieben eine mäßige Reaktion der Follikel, während FISHMAN und BAKER eine intensive Reaktion im Primärfollikel epithel und im Ovum fanden. Schwächer reagierten wachsende und reife Follikel. Die Theca externa und interna der Follikel zeigte eine intensive Enzymreaktion. Im Liquor, in der inneren Schicht der Membrana granulosa und in den Zellen des Cumulus oophorus war keine Aktivität nachweisbar. Das Corpus luteum und das Keimepithel reagierten intensiv.

Die biochemischen Untersuchungen am Ovarium führten mit verschiedenen Substraten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Menschliches Ovargewebe hydrolysierte in erheblichem Ausmaß Phenolphthaleinglucuronid (FISHMAN et al. 1947d), während mit 8-Benzoylamino-2-Naphthylglucuronid keine Aktivität im menschlichen Ovarium nachgewiesen werden konnte (RUTENBURG et al. 1953). Dagegen wurde mit dem Substrat im Ratten- und Mäuseovarium eine positive Reaktion beobachtet, auch Phenolphthaleinglucuronid wurde rasch hydrolysiert.

(TALALAY et al.; CONCHIE et al. 1959b).

Neuerdings wiesen LEVY et al. (1961) hohe Glykosidasen Aktivität im Corpus luteum von Mensch, Rind und Schwein nach. Phenolphthaleinglucuronid und Nitrophenylgalactosid (das Substrat zum β -Galactosidase Nachweis) wurde vom Gelbkörpergewebe rasch gespalten, während das übrige Ovargewebe die Substrate nur langsam hydrolysierte. Die Hydrolyse durch die Follikelflüssigkeit war sehr gering. Corpora lutea von schwangeren und nicht schwangeren Tieren zeigten keinen Aktivitätsunterschied (s. Tabelle Nr. I, S. 16). Histochemische Untersuchungen der β -Glucuronidase an normalen menschlichen Ovarien sind nicht bekannt.

Tabelle Nr. I

Lokalisation der β -Glucuronidase im Ovarium

<u>Autor</u>	<u>Spezies</u>	<u>Substrat</u>	<u>Keimepithel</u>	<u>Primärfollikel</u>	<u>Ovum</u>	<u>reifer Follikel</u>	<u>Theca granulosa</u>	<u>Liquor</u>	<u>Corpus luteum</u>
SELIGMAN et al. (1954)	Ratte	6-Brom-2-Naph- thyl- β -Glucopy- ruonosid	(+)			+	(+)		
FISHMAN, BAKER (1956)	Ratte	8-Hydroxychino- lin-Glucuronid	++	++	++	+	+	-	++
Eigene Untersuchung	Mensch	" "	-/++	-	-/ Plasma	+	-	-/(+)	++
LEVY et al. (1961)	Rind	Phenolphthalein- β -D-Glucuronid	+					-	+++
(biochemisch)	Schwein		+					-	++
	Mensch	46 J.	+					-	+
		51 J.	re +/ 11 -					-	++ re
		67 J.	+						

Die Befunde von LEVY et al. gelten auch für die

β -Galactosidase, als Substrat wurde Nitrophenyl-Galactosid benutzt.

Eigene Methodik

Die β -Glucuronidase wurde histochemisch in 22 Ovarien, 5 Corpora lutea menstruationis und 9 Corpora lutea graviditatis von Frauen im Alter von 17-60 Jahren untersucht. Das bei Operationen entnommene Gewebe wurde im Kryostaten bei -20°C bis zur Verarbeitung aufbewahrt.

Azofarbstoffmethode nach BURTON und PEARSE

Substratlösung:

10,0 mg 8-Hydroxychinolinglucuronid ($=0,003 \text{ m}$)

10,0 ml 0,1 m Azetatpuffer von pH 5,2

10,0 mg Echt Blau RR (4-Benzoylamino-2-5-Dimethoxy-anilin)

Die 20μ dicken Kryostatschnitte wurden vor der Inkubation 5 Minuten bei Zimmertemperatur zum Auftauen und Trocknen aufbewahrt und mit einem Ring aus Paraffinwachs umgeben, damit nicht der ganze Objektträger von der Substratlösung bedeckt sein mußte. Die Lösung wurde direkt auf die Präparate gefiltert. In einer Petri-Schale, deren Deckel mit einem feuchtem Filterpapier zur Bildung einer "feuchten Kammer" ausgekleidet war, wurden die Präparate bei 37°C 4 Stunden inkubiert.

Die Wachsringe wurden anschließend unter fließendem Wasser entfernt. Es wurde eine Kernfärbung mit Mayer's Haemalaun durchgeführt (5 Minuten). Die Präparate wurden 30 Minuten in fließendem Wasser gewaschen und nach dem Trocknen in Glycerin-Gelatine eingedeckt.

Die Reaktion führte an Stellen der Enzymaktivität zu einer Ablagerung orange-roter Farbstoffpartikel, die aus dem Spaltprodukt 8-Hydroxychinolin und dem Farbstoff Echt Blau RR entstanden.

Nach einer Inkubation von nur 2 Stunden erfolgte keine Reaktion, während nach 4stündiger Inkubation bei Zimmertemperatur ein positiver Ausfall beobachtet wurde.

Die Kupplung mit dem Diazoniumsalz Echt Blau B anstatt mit Echt Blau RR ergab einen diffusen über das ganze Präparat

verteilten Niederschlag, sodaß eine Lokalisation nicht möglich war.

Die nachträgliche Fixierung der Gewebeschnitte in 4%igem Formalin bei 4°C für 30 Minuten bis zu 3 Stunden führte zu einer geringeren Färbung im Vergleich zu unfixierten Kontrollschnitten. Die Lokalisation der Enzymaktivität war nicht verbessert. Bei der Inkubation von Mikrotomschnitten, die vorher als Gewebestücke 2 Stunden in 4%igem Formalin fixiert waren, erschienen die Stellen der Enzymreaktion scharf begrenzt, und die Größe der einzelnen Farbstoffpartikel war gegenüber unfixierten Schnitten vermindert.

Ohne Substrat inkubierte Kontrollschnitte zeigten keine Reaktion.

β -Glucuronidase Nachweis nach SELIGMAN et al.

Substratlösung:

- 30,0 mg 6-Brom-2-Naphthyl- β -D-Glucopyruronosid,
- 5,0 ml reines Methanol,
- 20,0 ml Phospho-citrat Puffer (pH 5,0)
- 75,0 ml Aqua dest.

Die Kryostatschnitte wurden 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie in Leitungswasser gespült. Die Kuppung des Reaktionsproduktes, des Bromnaphthol, erfolgte mit dem Echtblausalz B (tetrazotiertes Diorthoanisidin), das in kaltem, 0,02 m Phosphatpuffer von pH 7,5 im Verhältnis 1:1 gelöst war. Nach 2 Minuten wurden die Präparate in Aqua dest. gewaschen, in 0,1%iger Essigsäure gespült und nach dem Trocknen in Glycerin-Gelatine eingedeckt. Rote Farbstoffpartikel waren in den fermentaktiven Strukturen des Gewebes zu erkennen.

Nachträglich in 10%igem Formalin fixierte Präparate (10 Minuten) zeigten eine mäßige Reaktion, einen schwachroten Niederschlag der Farbstoffpartikel. Auch an unfixierten Präparaten war die Reaktion nicht sehr intensiv. Ein Unterschied in der Enzymlokalisation ließ sich nicht feststellen. Eine Diffusion des Endproduktes wurde nicht beobachtet.

Außerdem wurde die β -Glucuronidase nach der Methode von FRIEDENWALD und BECKER in der Modifikation von FISHMAN und BAKER nachgewiesen.

Substratlösung nach FISHMAN und BAKER

Lösung 1:

- a) Lösung von 50,0 mg 8-Hydroxychinolin in 30,0 ml 0,1 m Azetatpuffer (pH 5,0) durch Erwärmen im Wasserbad.
- b) Lösung von 1,522 g Eisensulfat ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in 100,0 ml Aqua dest. durch Erwärmen im Wasserbad, bis die Lösung klar und orange wird.
- c) Mischung von 20 ml Eisensulfatlösung mit der 8-Hydroxychinolinlösung und Aufbewahrung für 2 Stunden im Brutschrank.

Die Lösung wurde 15 Minuten bei 2000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und 1/4 der Menge mit Lösung 2 vermischt.

Lösung 2:

Lösung von 25,0 mg 8-Hydroxychinolinglucuronid in 0,5 ml 1,0 m Azetatpuffer (pH 5,0) durch Erwärmen im Wasserbad.

Das Lösungsgemisch wurde 15 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert und der Überstand direkt auf die mit Paraffinwachs umringten Kryostatschnitte gefiltert. In einer mit feuchtem Filterpapier ausgekleideten Petri-Schale wurden sie zunächst bei 7°C für 24 Stunden vorinkubiert und dann 1 1/2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Präparate 15 Minuten in einen 0,5 m Oxalatpuffer bei Zimmertemperatur eingestellt.

Der Puffer bestand aus:

2,87 g Natriumoxalat,
0,47 g Oxalsäure,
100,0 ml Aqua dest.

Nach 3 Minuten Waschen wurde eine gleiche Tropfenmenge 2%igen Kaliumferrocyanidlösung und N-Salzsäure auf die Präparate gegeben und durch vorsichtiges Bewegen vermischt. Aus den Eisenchelat, das aus der Reaktion zwischen Spaltprodukt und Eisensalz entstanden war, bildete sich das gut sichtbare Berliner Blau.

Nach 2 Minuten wurde die Lösung mit Aqua dest. abgespült. Dann wurde die Berliner Blau-Reaktion mit 10 Minuten Einwirkdauer wiederholt. Anschließend wurden die Präparate 15 Minuten in Aqua dest. gespült und die Kerne mit Neutralrot gefärbt. Die Präparate wurden in der aufsteigenden Alkoholvereinigung (70%, 96%, 100% für je 5 Minuten) dehydriert, in Xylol gereinigt und mit Diatex eingedeckt.

Nach 4stündiger Inkubation ohne Präinkubation war die Fermentreaktion nur schwach. Nach 4 Stunden Inkubationszeit mit vorausgegangener Präinkubation bei 6°C wurde ein sehr starker, teilweise diffuser Niederschlag von Berliner Blau gefunden.

Die Lagerung des Materials im Kryostaten bei -20°C bis zu 20 Tagen hatte keinen sichtbaren Einfluß auf die Fermentreaktion im Vergleich zu sofort nach der Entnahme verarbeiteten Ovarien.

Eigene Befunde

Die Oberfläche des Ovarium wird von einem einschichtigen Epithel bedeckt, das kubisch oder zylindrisch ist und an manchen Stellen fehlt. Eine intensive Reaktion als Zeichen starker β -Glucuronidase-Aktivität war in dieser Zellschicht in den Präparaten zu erkennen, die nach der Methode von FISHMAN und BAKER behandelt waren. Keinen oder nur einen geringen Niederschlag im Oberflächenepithel zeigten die nach der Methode von BURTON und PEARSE oder SELIGMAN et al. inkubierten Präparate.

Die Tunica albuginea unter dem Keimepithel wird von einer schmalen Schicht spindelförmiger Fibrocyten gebildet, die parallel zur Oberfläche angeordnet sind. Die Zellen ließen keine Fermentreaktion erkennen.

Die Rindensubstanz, die Zona parenchymatosa des Eierstocks besteht aus dicht gelagerten Bindegewebszellen und aus kollagenen Fasern. Hier liegen und entwickeln sich die Follikel. An einigen Stellen des Rindenparenchyms waren Farbstoffgranula zu finden. Nach der Methode von SELIGMAN blieb die Rinde ohne Reaktion.

Die Marksubstanz, die Zona vasculosa läßt sich von der Zona parenchymatosa abgrenzen. Dies Gewebe des Hilus enthält lok-ker angeordnetes Bindegewebe mit Gefäßen und Nerven. Das Markgewebe zeigte an einigen Stellen eine schwach positive Reaktion. Die dickwandigen Arterien und Arteriolen lie-ßen in einigen Präparaten eine geringe Färbung der Media erkennen, meist blieben sie ungefärbt, ebenso die Kapilla-ren und Venen.

Die Primär- oder Primordialfollikel, die in der Rinde lie-gen, bestehen aus der Eizelle und einem einschichtigen Epithel. In dem Kern der Eizelle und in dem Follikel-epithel wurde keine Fermentaktivität gefunden. Vereinzelt ließ das Eiplasma der Follikel eine deutliche Reaktion erkennen.

Bei den Sekundärfollikeln ist das Epithel mehrschichtig, es bildet die Membrana granulosa. Die Eizelle ist deutlich vergrößert. Diese Follikel sind im Vergleich zu den Primär-follikeln immer nur in geringer Zahl vorhanden. Der Nach-weis der β -Glucuronidase führte nur in einigen Fällen zu einer Reaktion im Plasma der Eizelle. Die meisten Sekun-därfollikel blieben ungefärbt.

Die Tertiärfollikel bilden die nächste Reifungsstufe im Follikelwachstum. Sie sind durch die Zona pellucida- der Grenzschrift zwischen Eizelle und Membrana granulosa- und den Liquor folliculi gekennzeichnet. Um die Tertiarfolli-kel differenziert sich eine Theca folliculi. Sie besteht aus der Tunica interna thecae mit den lipoidhaltigen The-cazellen und vielen Kapillaren und der Tunica externa thecae mit vorwiegend kollagenen Fasern. Deutliche in einem Fall schwache Fermentaktivität war in der Theca in-terna zu erfassen. Die Tertiarfollikel blieben in der Gra-nulosa und im Liquor ohne Reaktion.

Die reifen oder Graaf'schen Follikel sind 1,5-2,0 cm groß. Die Granulosa- und Thecazellen haben große Kerne. Die Thecaschicht enthält reichlich Gefäße. Eine deutliche Reak-tion zeigte die Theca interna eines gesprungenen Follikels, der Liquor war mäßig gefärbt.

Nur wenige Follikel gelangen zur Reife und zur Ovulation. Der größere Teil verfällt als Primärfollikel oder in einem späteren Reifestadium der Atresie. Die atretischen Primärfollikel sind an der verdickten Basalmembran des Epithels zu erkennen. Im Kern und Plasma der Eizelle bilden sich Vacuolen. Die Tertiär- oder Bläschenfollikel verlieren ihre runde Form. Häufig ist die Thecazellschicht verbreitert. Die Membrana granulosa ist an cystisch degenerierten Follikeln kaum noch zu erkennen. Einzelne Zellen schwimmen im Liquorraum (WATZKA).

Die atretischen Primärfollikel zeigten zum Teil eine Fermentreaktion im Plasma der Eizelle. Kern und Follikelepithel reagierten nicht.

Von den atretischen Sekundärfollikeln ließen nur einige im Eiplasma Enzymaktivität erkennen. Die meisten reagierten weder in der Eizelle noch im Epithel.

Die atretischen Tertiärfollikel waren unterschiedlich gefärbt. Ein Teil zeigte eine schwache Reaktion der Thecaschicht, in anderen Fällen reagierten die Thecazellen nicht. In den Granulosazellen war keine Aktivität zu erfassen. Die Reaktion der Theca schien vom Degenerationsgrad abhängig zu sein. Bei teilweiser Ausfüllung des Liquorraum durch Bindegewebe konnte keine Färbung beobachtet werden.

Die atretischen Graaf'schen Follikel reagierten in einigen Fällen mäßig, in anderen intensiv in der Theca interna. Die meist nur fragmentarische Granulosa ließ eine schwache oder keine Reaktion erkennen. Der Liquor blieb in den Präparaten, die nach der von SELIGMAN angegebenen Methode behandelt waren, ungefärbt. Die Reaktion von BURTON und PEARSE ergab zum Teil eine schwache Färbung. Dagegen zeigten die nach der Methode von FISHMAN und BAKER behandelten Präparate einen deutlichen Niederschlag von Berliner Blau im Liquorraum.

Die Corpora atretica thecalia mit der hyperplastischen Theca, die besonders häufig in der Schwangerschaft gefunden wurden, wiesen in der Theca eine intensive Reaktion auf.

Nach der Ovulation bildet sich aus dem Follikel das Corpus luteum. In die Granulosazellschicht sprossen Gefäße ein. Die Theca- und Granulosazellen sind vergrößert. Nach STIEVE et al. hat der Gelbkörper schon am 3. Tag nach der Ovulation das Blütestadium erreicht. Andere Autoren meinen, die Entwicklung sei erst nach 10 Tagen abgeschlossen (NOVAK).

Das Corpus luteum menstruationis zeigte in einem Fall im frühen Vaskularisationsstadium eine intensive Reaktion der Theca- und Granulosaluteinzellen. Die Thecaschicht schien an einigen Stellen noch stärker gefärbt als die Granulosa. Dort fand sich eine vermehrte Ablagerung in der Umgebung der Kapillaren. Ein etwa 2 Tage altes Corpus luteum reagierte nur mäßig in den Luteinzellen. In einem rund 6 Tage alten Gelbkörper war die Glucuronidase-Reaktion in den Thecaluteinzellen stärker als in den Granulosaluteinzellen. Das Bindegewebe wies in einigen Fällen eine geringe Aktivität auf. Im Blütestadium (6.-12. Tag) fand sich eine gleich stark positive Reaktion in den Theca- und Granulosaluteinzellen.

Corpora lutea nach der Menstruation zeigten nur eine mäßige Fermentreaktion in den Luteinzellen. Nur wenige Stellen in der Umgebung von Kapillaren ließen noch eine deutliche Aktivität erkennen.

Das Corpus fibrosum albicans entsteht aus dem rückgebildeten Corpus luteum. Die Luteinzellen gehen zugrunde und Bindegewebsfasern sprossen ein. An der Peripherie sind zahlreiche, lipidhaltige Makrophagen zu finden. Nur in wenigen Fällen wurde im Bindegewebe eine schwache Reaktion beobachtet. Die meisten Corpora albicantia, auch Gefäße und Makrophagen blieben ungefärbt.

Das Corpus luteum graviditatis des 1. Trimenon ist größer als das Corpus luteum menstruationis und sehr gefäßreich. Gelbkörper dieses Alters konnten bei Tubargraviditäten entnommen werden. Die Luteinzellen zeigten eine intensive β -Glucuronidase-Reaktion. An einigen Stellen reagierten die Thecazellen stärker als die Granulosazellen. Erhöhte

Fermentaktivität war in einigen Präparaten entlang der Bindegewebissepten zu beobachten.

Schwangerschaftsgelbkörper aus dem 5.-6. Monat und die bei Schnittentbindungen vom Ende der Gravidität entnommen wurden, reagierten im Luteingewebe deutlich schwächer als die aus jüngeren Schwangerschaften. Die Enzymaktivität war in der Umgebung der Gefäße mit intensiver Reaktion erfaßbar. (s. Tabelle Nr. III, S. 73)

2. β -Galactosidase (Lactase)

Biochemie

Die β -Galactosidase gehört wie die β -Glucuronidase zu den Glykosidasen. Die Substrate des Fermentes sind β -Galactosidverbindungen aus wenigen Zuckermolekülen. Dazu gehören Milchzucker, Cerebroside, Vicianose und Aminosucker.

Die β -Galactosidase wird oft zusammen mit der β -Glucosidase gefunden z.B. in der Hefe und im Mandelemulsin. Es wurde zunächst die Existenz eines spezifischen Fermentes für Galactosidbindungen bestritten. Jedoch fand HOFMANN (1933), daß das Emulsin der Kerne von *Rosa canina* β -Galactoside rasch hydrolysiert, die β -Glucoside dagegen nur sehr langsam spaltet. Das Emulsin der Sojabohne greift nur Galactoside an. Auch aus Bakterienstämmen gewonnener Fermentextrakt hydrolysiert nur Galactosidbindungen. Eine reiche Quelle für β -Galactosidase sind Luzernensamen und Kaffee (HELFERICH et al.).

Das Ferment der Bakterien wurde vielfach untersucht. WALLENFELS et al. (1959) gelang die Reinigung und Kristallisation des Enzyms aus *Escherichia coli*. Das Aktivitätsmaximum ist bei pH 7,3. Bei Säugetieren liegt das pH-Optimum im sauren Bereich, beim Schwein bei pH 6,0 (DAHLQUIST 1961a), bei der Maus bei pH 2,8 (MAIO et al.).

Die Hydrolyse wird durch Natrium- und Kalium-Ionen ($10^{-1}M$) beschleunigt. Aktivatoren sind auch Ammonium und Mangan-Ionen. Magnesium-Ionen wirken im sauren Milieu stärker

aktivierend als im alkalischen (REITHEL et al.; KUBY et al.).

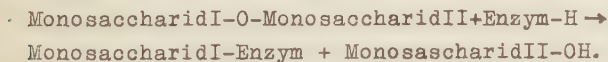
Die Galactosidase wird durch Schwermetallionen, Cystein und Glutathion gehemmt, außerdem durch Phenyl- β -Thiogalactosid und durch das fermentspezifische Aldonolacton (D-Galactono-1:4-Lacton) (CONCHIE, LEVY 1957; WALLENFELS 1952).

Die Fermentsynthese ist bei Bakterien induzierbar (MONOD). β -Galactosidase wird von Bakterien in einem Gemisch aus Aminosäuren, Adenosintriphosphat und Galactose gebildet. (BENZER). Penicillin und Chloramphenicol hemmen die Synthese (GALE et al.).

Die aus Hefe und Bakterien gewonnenen β -Galactosidasen haben verschiedene Hydrolyseraten. WALLENFELS (1959) führt diesen Unterschied auf einen andersartigen Aufbau des Ferment- oder Trägereiweißes zurück.

Die Galactosidase spaltet nicht nur Galactoside, sie überträgt das Spaltprodukt auch auf andere Substrate. Das kristallisierte Enzym bindet das Reaktionsprodukt besonders an Glucose (WALLENFELS). Das Ferment wirkt also als Transferase.

Papierchromatographische Untersuchungen ergeben, daß in der ersten Phase der Lactosespaltung nur die Glucose freiliegt, der Galactoseanteil wird von dem Enzym abgespalten und übertragen. WALLENFELS teilt folgendes Reaktionsschema mit:



Die synthetisierende Wirkung der Galactosidase wurde von BOURQUELOT beobachtet. Aus Alkohol und Galactose entsteht in Gegenwart von Mandelemulsin Alkyl- β -Galactosid. Ein Einfluß des Fermentes auf die Milchzuckersynthese wird bestritten (AMMON).

Der biochemische Nachweis der β -Galactosidase beruht auf der Spaltung des O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid. Dünndarmgewebe von Säugetieren und vom Menschen bewirkt eine rasche Hydrolyse des Substrates (DAHLQUIST 1961b). Wenn

Milchzuckerhaltige Nahrung aufgenommen wird, ist das Ferment im Darmsaft nachweisbar. Der Darm besitzt die Fähigkeit der adaptiven Fermentbildung (LEHNARTZ). Beobachtungen am Rattendarm ergaben in den letzten Tagen der Tragzeit und während der Laktation einen erhöhten Enzymspiegel (ALVAREZ et al.).

In allen Organen der Maus wird β -Galactosidase gefunden (MAIO et al.). Neben dem Dünndarm zeigen Milz und Lymphknoten hohe Aktivität. Außerdem sind hohe Enzymkonzentrationen in Leber, Niere und Uterus nachweisbar (COHEN et al.; NEUBERG et al.). Die Untersuchungen ergeben, daß bei pH 5,0 nur noch 55% der maximalen Aktivität vorhanden ist.

Die Galactosidase-Aktivität in den Geschlechtsorganen steht unter dem Einfluß der Sexualhormone. Nach Orchidektomie fällt der Enzymspiegel im Epididymis ab und kann durch Testosterongaben wieder normalisiert werden. Im Mäuseuterus sinkt die Fermentkonzentration nach Ovaryektomie, durch Oestrogengaben wird sie auf Normalwerte erhöht (CONCHIE 1957). Im Vaginalsekret wird β -Galactosidase gefunden. (CONCHIE et al. 1959a).

Die β -Galactosidase ist am Katabolismus der Mucopolysaccharide und Glykoproteide beteiligt (CONCHIE 1959b).

In Gewebehomogenaten liegt die Enzymaktivität im Überstand. Durch Trypsinverdauung kann die Galactosidase von ihren Plasmastrukturen getrennt werden. Die Fraktionierung ergibt, daß das Ferment wie auch die β -Glucuronidase an die Lysosomen gebunden ist (DAHLQUIST 1961a; SELLINGER et al. 1960).

Histochemie

Eine Methode zum histochemischen Nachweis der β -Galactosidase wurde zuerst von COHEN et al. (1952) angegeben. Als Substrat benutzten die Autoren 6-Brom-2-Naphthyl- β -D-Galactopyranosid. Die Bromverbindung wird 6-10mal schneller hydrolysiert als Naphthyl-Galactosid. Das Spaltprodukt ist ausreichend unlöslich, wodurch eine nachträgliche Kupplung mit dem Farbstoff möglich wird.

Zur Aktivierung des Enzyms werden die Präparate zunächst in Kochsalzlösungen steigender Konzentrationen (1%-6%) gebracht. Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 2 Stunden.

Die gleichzeitige Kupplung des Spaltproduktes mit einem Diazoniumsalz kann nicht durchgeführt werden, da der Farbstoff die Fermentreaktion hemmt. Die Kupplungsreaktion erfolgt nachträglich mit den Echtblausalz B (tetrazotiertes Diorthoanisidin). Blau-violette Farbstoffgranula sind an enzymaktiven Stellen des Gewebes zu erkennen.

Die beobachteten Diffusionsartefakte werden durch die Inkubation mit Kochsalz in 1,0 m Konzentration vermindert. Azetonfixierung und Paraffineinbettung führt zu einem beträchtlichen Aktivitätsverlust. Im Vergleich zu biochemischen Untersuchungen kann β -Galactosidase histochemisch nur in Organen mit hoher Enzymkonzentration nachgewiesen werden.

Untersuchungen über den Einfluß der Fixation auf das Ferment ergeben einen 75%igen Aktivitätsverlust nach 24 Stunden Fixation in 10%igem Formalin bei 4°C. Azeton bewirkt in der gleichen Zeit eine Hemmung bis zu 15%, reiner Alkohol bis zu 90%. Methylalkohol hemmt die Reaktion erst, wenn die Substratlösung über 10% enthält. Dies ist für den histochemischen Nachweis von Bedeutung, da das Substrat in Methanol gelöst wird (COHEN et al.).

Die Methode wurde von RUTENBURG et al. (1958) weiter entwickelt. Sie benutzten Substrat und Farbstoff wie COHEN et al. Das Gewebe wurde 2 Stunden bei 37°C in Formalin fixiert. Zur Inkubation kamen frei flottierende Mikrotomschnitte. Nach der Inkubation unfixierter Kryostatschnitte war die Enzymlokalisation durch Diffusionsartefakte erschwert.

An den fermentaktiven Strukturen des Gewebes waren purpurne oder blaue Farbstoffgranula zu erkennen. Diese entstanden aus der Kupplung des Echt Blau B an das Spaltprodukt Bromnaphthol. Nach der Inaktivierung des Fermentes durch Hitze konnte keine Reaktion ausgelöst werden.

Eine Fehlerquelle der Methode ist die Fettlöslichkeit des Bromnaphthol. Stark lipidhaltiges Gewebe wird rot gefärbt.

Das von den Autoren untersuchte Rattengewebe zeigte in den meisten Organen eine starke β -Galactosidase-Reaktion. Der Farbstoff wurde im Cytoplasma gefunden. Zellkerne und Blutgefäße blieben ungefärbt. Die Niere reagierte intensiv in den proximalen und distalen Tubuli und in der Henle'schen Schleife. Das Leberparenchym war stark gefärbt mit besonderer Intensität im zentralen Gebiet der Leberläppchen. Die Kupffer'schen Sternzellen reagierten deutlich. In der Milz fand sich eine starke Färbung der roten Pulpa. Außerdem wurde eine positive Reaktion in den parietalen Zellen der Pars glandularis des Magens und im Epithel des Duodenum beobachtet. Das Bronchialepithel, das Follikelepithel der Schilddrüse und die serösen Zellen der Submaxillardrüse reagierten intensiv. Hohe Fermentaktivität lag im Epithel des Epididymis, im Vas deferens und im Uterus in den basalen Anteilen des Endometrium vor. Die Leukocyten zeigten eine intensive Fermentreaktion.

Eine starke Aktivität der Submaxillardrüse wurde auch bei anderen Tieren gefunden. Die Azini der Parotis reagierten intensiv (CHAUNCEY et al. 1961). Im Knochengewebe waren die Osteoklasten und die Gefäßendothelien deutlich gefärbt. Die Knorpelzellen zeigten eine stark positive Reaktion (SCHLAGER). Die biochemischen Ergebnisse hoher Enzymaktivität in Niere, Milz Leber und Epididymis bestätigten die histochemischen Befunde (CONCHIE 1957a).

Biochemische Untersuchungen an Ovarien von Ratte und Maus ergaben eine rasche Hydrolyse des O-Nitrophenyl- β -D-Galactosid. Das Rattenovarium zeigte eine stärkere Aktivität als Milz, Leber und Uterus, während bei der Maus der Uterus eine höhere Fermentkonzentration aufwies als das Ovarium (CONCHIE 1957a). Außer β -Galactosidase und β -Glucuronidase wurden α -Mannosidase und N-Acetylglucosaminidase im Ratten- und Mäuseovarium nachgewiesen (CONCHIE, FINDLAY 1959).

Die kolorimetrische Auswertung der Spaltung des 6-Brom-2-Naphthylgalactosid ergab im Ovar der Ratte eine deutliche geringere Aktivität als im Uterusgewebe (COHEN et al. 1952). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Befunden von

CONCHIE. Im Ovar des Hundes war β -Galactosidase Aktivität nachweisbar. Menschliches Ovargewebe spaltete das Substrat nicht.

Neuere Untersuchungen von LEVY et al. (1961) am Corpus luteum ergaben hohe Fermentaktivitäten bei Mensch, Rind und Schwein. Das übrige Ovargewebe hydrolysierte nur in geringem Ausmaß O-Nitrophenyl- β -D-Galactosid, während die Follikelflüssigkeit keine Wirkung hatte.

Histochemische Untersuchungen zur Lokalisation des Enzyms β -Galactosidase im Ovar sind in der Literatur nicht mitgeteilt worden.

Eigene Methodik

Die β -Galactosidase wurde histochemisch in 10 Ovarien, 2 Corpora lutea menstruationis und 6 Corpora lutea graviditatis von gesunden Frauen nach der Azofarbstoffmethode von RUTENBURG et al. nachgewiesen.

Inkubationslösung:

100,0 mg 6-Brom-2-Naphthyl- β -D-Galactopyranosid

15,0 ml Methanol

200,0 ml Aqua dest. von 70°C.

Nach Abkühlung der Lösung, Zugabe von

85,0 ml Phospho-zitrat Puffer (pH 5,0)

100,0 ml Aqua dest.

Pufferlösung aus gleichen Volumen

0,2 m Dinatriumphosphat

0,1 m Zitronensäure.

Die Lösung wurde im Eisschrank aufbewahrt.

Nach einer Inkubation von 4 Stunden bei 37°C zeigten die Kryostatschnitte keine Reaktion, deshalb wurden die Präparate bei Zimmertemperatur (22°C) 8 Stunden inkubiert.

Nach der Bebrütung wurden sie 3mal für je 3 Minuten in Aqua dest. gewaschen und in die frisch bereitete Kupplungslösung aus

50,0 mg Echt Blau B und

50,0 ml NaHCO₃-Lösung (pH 7,5)

übertragen. Nach 5 Minuten wurden die Präparate 3 Minuten in Leitungswasser gewaschen und nach dem Trocknen mit Glycerin-Gelatine eingedeckt.

Blau-violette Farbstoffgranula waren an Stellen der Enzymaktivität zu erkennen.

Die nachträgliche Fixierung in 10%igen Formalin für 10 Minuten ergab im Vergleich zu unfixierten Präparaten keinen Unterschied in der Enzymlokalisation. Farbintensität und Partikelgröße waren gleich. Die formalinfixierten Kryostat-schnitte zeigten etwas dunklere Farbstoffgranula.

In einigen Präparaten wurden die Kerne mit Kern-Echtrot dargestellt.

Die Lagerung des Operationsmaterials im Kryostaten bis zu 4 Wochen hatte keinen sichtbaren Einfluß auf die Fermentreaktion.

Eigene Befunde

Das Oberflächenepithel und die Tunica albuginea der Ovarien ließen keine Färbung als Zeichen einer β -Galactosidase Aktivität erkennen.

Im Rinden- und Markgewebe war keine Fermentaktivität erfaßbar. In einem Fall wurde eine mäßige Färbung der Media einer Arterie im Hilusgebiet beobachtet. Die Gefäße zeigten sonst keine Reaktion.

In den Primärfollikeln waren die meisten Kerne der Eizelle ungefärbt, nur einige ließen eine schwache Reaktion erkennen. Plasma und Epithelzellen zeigten keine Aktivität.

In den Sekundärfollikeln wurde keine Fermentaktivität gefunden.

Die meisten Tertiärfollikel wiesen keine Färbung in den Theca- und Granulosazellen und im Liquor auf. Nur wenige Follikel ließen eine mäßige Reaktion der Thecazellen erkennen.

Ein gesprungener Graaf'scher Follikel reagierte positiv in der Thecaschicht. Die Granulosa und der Liquor blieben ungefärbt.

Die atretischen Primärfollikel zeigten meist keine Reaktion. Vereinzelt wurde eine Färbung im Eizellkern beobachtet.

Die atretischen Sekundär- und Tertiärfollikel blieben im Epithel bzw. in der Granulosa, in der Theca, im Liquor und in der Eizelle ohne Reaktion.

In den atretischen Graaf'schen Follikeln war in der Granulosa und im Liquor keine Enzymaktivität nachweisbar. Die Thecazellschicht reagierte unterschiedlich. Bei geringgradiger Atresie fand sich eine mäßige oder keine Reaktion. Dagegen reagierte die verbreiterte Theca deutlich.

Die Corpora lutea menstruationis zeigten eine intensive Fermentreaktion in den Theca- und Granulosaluteinzellen. Die höchste Intensität der Reaktion lag in der Umgebung der Kapillaren. Ein Unterschied in der Farbintensität der Theca- und Granulosazellen war nicht festzustellen. Die größte Enzymaktivität zeigten die Gelbkörper bis zu einem Alter von etwa 9-10 Tagen. Danach, besonders nach der Menstruation, war eine deutliche Abnahme der Reaktion zu beobachten. Ein rund 4 Wochen altes Corpus luteum zeigte nur noch eine schwache Färbung des untergehenden Luteingewebes. Das Bindegewebe blieb ungefärbt.

Die Corpora albicantia reagierten weder im rückgebildeten Luteingewebe noch im Bindegewebe. Dagegen war in den am Rande liegenden Makrophagen eine rot-blaue Färbung zu erkennen.

In den Corpora lutea graviditatis des 1. Trimenon war eine intensive Reaktion in den Theca- und Granulosaluteinzellen erfaßbar. In der Umgebung der Kapillaren war die Ablagerung der Farbstoffgranula am dichtesten. Das Bindegewebe ließ keine Fermentaktivität erkennen.

Gelbkörper von Schnittenbindungen am Ende der Schwangerschaft zeigten eine deutliche geringere Fermentaktivität als Corpora lutea von jüngeren Schwangerschaften. Die Galactosidase-Reaktion fiel an den Bindegewebssepten am stärksten aus. Außerdem war wieder eine vermehrte Färbung in der Umgebung der Kapillaren zu erkennen.

Die Corpora atretica thecalia mit der hyperplastischen Theca, die sich besonders häufig während der Schwangerschaft im Eierstock finden, reagierten intensiv.

In den Präparaten mit Kern-Färbung war zu erkennen, daß die Farbstoffpartikel im Cytoplasma lagen.

Das Luteingewebe zeigte neben den Farbstoffgranula eine leichte, rote Färbung, die auf die Lipidlöslichkeit des Spaltproduktes Bromnaphthol zurückzuführen ist.

II. Leucin-Aminopeptidase

=====

Biochemie

Die Leucin-Aminopeptidase gehört als eiweißspaltendes Ferment zur Gruppe der Peptidasen. Das Enzym hydrolysiert endständige Peptidbindungen ($-\text{CO}-\text{NH}-$) und ist eine Exopeptidase.

LINDERSTRÖM-LANG (1929) fand im Darmerepsin ein Ferment, das Leucylglycin und Leucyldiglycin rasch hydrolysiert. Es wurde "Leucin-Aminopeptidase" genannt. JOHNSON et al. (1936, 1942) gelang die Azetonfällung und Darstellung des Fermentes aus der Mucosa des Intestinum.

Die Wirkung der Leucin-Aminopeptidase ist von der freien α -Aminogruppe des Substrates abhängig, dagegen hat die Carboxylgruppe keine wesentliche Bedeutung (SMITH et al. 1955). Die wichtigsten Substrate des Enzyms sind L-Leucylglycin, L-Leucyldiglycin und L-Leucinamid. Das Ferment spaltet nicht nur Substrate mit einer Leucylgruppe. Andere Peptide und Amide aliphatischer Aminosäuren werden in geringem Ausmaß hydrolysiert. Die Hydrolyserate ist von der Länge der Seitenkette am endständigen Stickstoff abhängig (SMITH 1951).

Die Leucin-Aminopeptidase zeigt eine strenge optische Spezifität. Nur Substrate mit L-Konfiguration werden gespalten, das D-Isomer wird nicht angegriffen.

Das Enzym wird durch Magnesium- und Mangan-Ionen aktiviert (JOHNSON et al. 1936). Das Magnesium-Ion ist als Metallbestandteil der Leucin-Aminopeptidase von größerer Bedeutung. Dies beweist die Hemmung des Fermentes durch Zitrat, die auf einer Wechselwirkung mit Magnesium beruht.

Einige Autoren konnten eine Aktivierung durch Magnesium- und Mangan-Ionen nicht nachweisen. Es ist möglich, daß bei der Versuchsanordnung eine optimale Ionenkonzentration vorlag und eine Intensivierung wirkungslos blieb (GOMORI 1954a, GREEN et al.).

Die Leucin-Aminopeptidase ist ein Magnesiumprotein mit einem Molekulargewicht von 300000 (SPACKMAN 1955). Die Aktivität des Enzyms ist von der Metallionen-Konzentration abhängig.

Das Ferment wird durch Metallgifte wie Cyanid (0,01 m) und Versen (Äthylendiamintetraessigsäure) gehemmt. Außerdem sind Kupfer, Blei, Cadmium, Quecksilber und Eisen wirksame Inhibitoren (SMITH 1951; GLENNER et al.; BURSTONE und FOLK).

Der optimale pH-Bereich für die Aktivität der Leucin-Amino-peptidase aus der Darmmucosa liegt zwischen pH 8,0-9,5. Eine deutliche Hydrolyse ist noch bei pH 6,5-7,0 nachweisbar (BERGER, JOHNSON). Für das durch Magnesium-Ionen aktivierte Ferment der Rattenniere liegt das Maximum bei pH 9,3, nach Mangan-Ionen Aktivierung bei pH 9,1 (SMITH et al. 1955). Die Leucin-Amino-peptidase aus der Milz (früher auch Kathepsin III genannt) hat ein Wirkungsoptimum im sauren Bereich bei pH 5,0. Das Enzym wird durch Cystein und Ascorbinsäure aktiviert (HOFFMANN-OSTENHOF).

Das Ferment wirkt durch die Bildung eines Substrat-Enzymkomplexes. Das Substrat wird über das Metall-Ion gebunden (SMITH 1951).

In Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren ist die Leucin-Amino-peptidase weit verbreitet. Sie ist in Bakterien, im Kohl und Spinat nachweisbar (BERGER, JOHNSON; JOHNSON, BERGER). Bei Tieren und beim Menschen wird das Ferment im Darmsaft und in der -schleimhaut gefunden. Außerdem zeigen Niere, Leber, Milz, Pankreas, Lunge, Herz und Gehirn der Ratte eine hohe Enzymaktivität (SMITH 1944, 1947; GREEN et al.; POPE, ANFENSEN). Ein rascher Anstieg des Serumfermentes wird nach Verbrennungen beobachtet (ZAMECNIK). Untersuchungen des menschlichen Blutes ergeben eine erhöhte Aktivität in der Schwangerschaft (GREEN).

Erhöhte Leucin-Amino-peptidase-Aktivität wird in Karzinomgewebe gefunden. Sie wurde zuerst bei der Ratte beobachtet (BERGER, JOHNSON). Beim Colon-, Magen- und Mammakarzinom ist die Enzymkonzentration erhöht. Auch im Serum und Urin der Patienten ist eine gesteigerte Fermentaktivität nachweisbar (GLENNER et al.). Beim Colon-Karzinom wird der Anstieg im Urin vor dem Serumanstieg beobachtet (GOLDBARG et al.).

Am Rande der Tumoren ist die Fermentaktivität am höchsten. Es wird deshalb eine Beziehung zwischen infiltrativem Wachstum und der Aktivität proteolytischer Fermente angenommen. Durch die Proteolyse wird das intakte Gewebe angegriffen und das Wachstum der Tumorzellen ermöglicht (SYLVEN et al., 1957; GLENNER et al.).

Biochemische Versuche zeigen, daß die Leucin-Aminopeptidase neben der Spaltung auch eine Synthese der Peptidbindungen bewirkt (FRUTON et al.).

Einige Autoren bestreiten die Existenz eines spezifischen Enzyms für die Spaltung der Leucylverbindungen (WALDSCHMITZ-LEITZ). Die Substrate sollen von einem Gemisch aus Di- und Polypeptidasen gespalten werden (GLENNER et al.). PATTERSON et al. fanden bei Untersuchungen von Asziteszellhomogenaten eine Spaltung des L-Leucyl- β -Naphthylamid durch verschiedene Fraktionen. Modellversuche mit reinen Proteinasen und Peptidasen zeigen, daß L-Leucyl- β -Naphthylamid nicht nur von der Leucin-Aminopeptidase, sondern auch von der Prolinase (Iminopeptidase), dem α -Chymotrypsin und einem mit dem Kathepsin C assoziierten Ferment gespalten wird (SYLVEN et al. 1962).

Neuere Untersuchungen unterstützen die These über die Unspezifität der Aminopeptidase. Chromogene Substrate werden von den einzelnen Organen unterschiedlich hydrolysiert. Die Aktivität der Fermente wird durch Fixierung und durch Änderung des pH nicht übereinstimmend beeinflusst (NACHLAS et al. 1962b; PATTERSON et al.). Von SMITH et al. (1955) wird angenommen, daß das Leucinamid nur von der Leucin-Aminopeptidase gespalten wird.

In Gewebekomogenaten wird das Ferment vorwiegend im Überstand gefunden. Die Mitochondrien und Mikrosomen zeigen eine schwache Aktivität, während die Kerne inaktiv sind (DIXON 1958).

HANNIBAL et al. untersuchten das Verhältnis von Lyo- zu Desmokonponente bei der Leucin-Aminopeptidase. Mit steigendem pH wächst der Anteil des Desmoenzym. Bei pH 7,0 ist

die Diffusion der Lyokomponente am schwächsten. Dies ist für die histochemische Lokalisation, die in diesem pH-Bereich durchgeführt wird, von Bedeutung.

Histochemie

Die ersten histochemischen Untersuchungen der Amino-peptidase wurden von GOMORI (1954a) durchgeführt, Das Substrat war Chloroacetyl- β -Naphthylamid, das für den Serumnachweis des Fermentes benutzt wurde. Es fand eine rasche Spaltung des Substrates in azetonfixiertem Gewebe statt. Das Reaktionsprodukt, das freie Naphthylamin, wurde mit dem Farbstoff Garnet GBC (diazotiertes o-Aminoazotoluen) gekuppelt.

Später benutzte GOMORI (1954b) Glycyl- β -Naphthylamid und DL-Alanyl- β -Naphthylamid als chromogene Substrate. 12-24 Stunden in kaltem, neutralen Formalin fixierte Gefrierschnitte zeigten nach Inkubation von einigen Minuten eine intensive Reaktion. Azetonfixierte Paraffinschnitte mußten 1-2 Stunden inkubiert werden. Der Nachteil dieser Reaktion beruht auf der schnellen Reorganisation des Azofarbstoffes zu großen Kristallen, sodaß die Präparate gleich ausgewertet werden müssen.

Von GREEN et al. und von FOLK und BURSTONE (1955) wurde L-Leucyl- β -Naphthylamid-Hydrochlorid für den Leucin-Amino-peptidase Nachweis synthetisiert. Photoelektrische Messungen ergaben, daß die Substanz vom Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin nicht hydrolysiert wird. Das D-Isomer wird von der Leucin-Amino-peptidase nicht gespalten.

Die histochemischen Untersuchungen führten zu unbefriedigenden Ergebnissen. Frische und formalinfixierte Präparate zeigten eine beträchtliche Diffusion des Spaltproduktes. Die Färbung war nach Inkubationszeiten bis zu 5 Stunden nur mangelhaft. (GREEN).

BURSTONE und FOLK (1956) arbeiteten eine häufig wiederholte Methode zum histochemischen Nachweis der Leucin-Amino-peptidase aus. Als Substrat benutzten die Autoren L-Leucyl- β -Naphthylamid und DL-Alanyl- β -Naphthylamid. Die Inkubations-

zeit betrug 15 Minuten bis 4 Stunden bei 24°C. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt durch die Kupplung mit dem Diazoniumsalz Garnet GBC sichtbar gemacht. Die Enzymlokalisation war mit beiden Substraten gleich. Die Alaninverbindung wurde rascher hydrolysiert. Die Autoren diskutierten eine zusätzliche Spaltung durch ein anderes Ferment. Eine vollständige Hemmung der Reaktion wurde durch Versen, Cyanid- (0,01 m), Kupfer- und Cadmium-Ionen hervorgerufen. Cyanid in geringerer Konzentration (0,0001 - 0,0003 m) bewirkte eine Aktivierung des Fermentes (BERGER und JOHNSON).

Die Methode von NACHLAS et al. (1957) beruhte ebenfalls auf der Spaltung des L-Leucyl- β -Naphthylamid. Als Kupplungsreagens wurde Echtblausalz B (tetrazotiertes Diorthoisidrin) benutzt. Kryostatschnitte wurden bei 37°C für 15 Minuten bis zu 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Präparate in eine Kupfersulfatlösung eingestellt. Der rote Azofarbstoff aus Echt Blau B und Naphthylamin wurde durch die Chelatbildung mit dem Kupfer-Ion tiefblau. Das Kupferchelate war auch in organischen Lösungsmitteln völlig unlöslich.

Ein neues Substrat wurde von ROSENBLATT et al. synthetisiert. Durch Einführung einer Methoxy-Gruppe entstand L-Leucyl-4-Methoxy- β -Naphthylamid. Die Elektronen-festsetzende Gruppe beschleunigte die Kupplung mit dem Diazoniumsalz.

NACHLAS et al. (1960) verwandten dieses Substrat für den Leucin-Aminopeptidase Nachweis. Die Kupplung des Spaltproduktes mit Echt Blau B erfolgte 40mal schneller als mit Naphthylamin. Dadurch wurden die Diffusionsartefakte der alten Methode vermindert. Durch die Bindung an Kupfer wurde wieder ein stabiles, nicht lipidlösliches Metallchelate gewonnen.

Der von BURSTONE und FOLK benutzte Farbstoff Garnet GBC hat 3 Nachteile gegenüber Echt Blau B:

1. Die Kupplung mit dem Reaktionsprodukt ist in Gewebeschnitten langsamer, dadurch ist die Diffusion des Naphthylamin erhöht (NACHLAS et al. 1961).
2. Der entstandene Azofarbstoff reorganisiert sich in kurzer Zeit zu groben Kristallen (GOMORI 1954).

3. Der Azofarbstoff kann nicht in ein stabiles Metallchelat überführt werden (NACHLAS et al. 1957).

Die Hydrolyse der Leucin-Amino-peptidase wird durch Echt Blau B bei pH 7,0 um etwa 50% gehemmt. Mit steigendem pH nimmt die hemmende Wirkung stark zu, während Garnet GBC die Reaktion über den ganzen Bereich nur bis zu 30% mindert (NACHLAS et al. 1962). Die Befunde sind nicht auf eine Verbindung des Farbstoffes mit dem Substrat zurückzuführen, da dieses bei der geringen Farbstoffkonzentration immer noch in ausreichender Menge vorhanden ist. Wahrscheinlich wird das Enzym durch den Farbstoff gehemmt (NACHLAS). Da Echt Blau B die Fermentaktivität im alkalischen Bereich stark mindert, kann die histochemische Reaktion nicht im optimalen pH-Bereich der Leucin-Amino-peptidase (8,0-9,5) durchgeführt werden. Das Ferment zeigt jedoch bis zu pH 6,5 deutliche Aktivität, die die Kupplung mit Echt Blau B ermöglicht.

Eine neue Methode zum Amino-peptidase Nachweis wird von BURSTONE et al. (1961) angegeben. Als Substrate benutzen die Autoren komplexe Verbindungen aus Aminen und aromatischen Ringen (z.B. 3-Amino-9-Äthylcarbazon). Durch die Hydrolyse wird das Amin freigesetzt und in Gegenwart eines oxydierenden Agens (Ferrocyanid) in einen unlöslichen Farbstoff umgewandelt. Es wird ein Eisenkomplex gebildet.

Die Vorbehandlung der Präparate in kaltem, neutralen Formalin für 1-2 Stunden führt zu keiner nennenswerten Minderung der Farbintensität. Der Aktivitätsverlust ist nachweisbar, wenn formalinfixiertes Gewebe homogenisiert und das Ferment durch Dialyse abgetrennt wird (HANNIBAL, NACHLAS). Durch absoluten Alkohol wird die Leucin-Amino-peptidase vollständig inaktiviert. Eine Azetonfixierung von 15 Minuten bei 2°C vor der Inkubation verhindert die Enzymdiffusion und die Zelldesintegration, außerdem werden die Lipide entfernt (NOVIKOFF et al.).

BURSTONE und FOLK lokalisierten die Leucin-Amino-peptidase in Organen der Ratte. Eine starke Reaktion wurde im Leber-

parenchym und in der Nierenrinde gefunden. Das Pankreas war besonders intensiv in den azinären Zellen gefärbt. Die Milz zeigte die stärkste Reaktion in der roten Pulpa. Das Zottenepithel und die Lieberkühn'schen Drüsen des Darmes reagierten intensiv.

NACHLAS et al. beobachteten eine andere Fermentlokalisation in der Nierenrinde. Nur der innere Anteil zeigte eine Reaktion, während BURSTONE und FOLK eine Färbung der ganzen Rinde beschrieben. Die übrigen Befunde stimmten überein.

Beim Meerschweinchen wurde außerdem hohe Fermentaktivität im Bronchialepithel, in der Zona glomerulosa und im Mark der Nebenniere gefunden. (NACHLAS et al. 1957). Untersuchungen der Haut ergaben eine intensive Reaktion der ekkrinen Schweißdrüsen. Die Mastzellen reagierten stark (BRAUN-FOLCO 1957/59). Intensiv gefärbt waren Leukocyten in Blut und Knochenmark (ACKERMANN; NACHLAS et al. 1960). Das Knochengewebe zeigte die stärkste Reaktion in den Osteoklasten (LIPP). NIEMI konnte in der Zirbeldrüse die Fermentreaktion nachweisen. Die Fermentaktivität in der Nebenschilddrüse war von der Parathormonbildung abhängig (PEARSE, TREMBLAY). Die Brustdrüse reagierte intensiv in der Schwangerschaft, während der Laktation war sie nur mäßig gefärbt (TALANTI).

Die stärkste Fermentaktivität der weiblichen Genitalorgane wurde im Zylinderepithel des Zervixkanals und in den Zervixdrüsen gefunden. Die Färbung des Drüsenepithel des Endometrium zeigte zyklusbedingte Unterschiede (FUHRMANN 1959). Erhöhte Aktivität war in entzündlichen Infiltraten und beim Karzinom der Portio zu erkennen (FUHRMANN 1961).

Die biochemisch gefundene hohe Leucin-Aminopeptidase Konzentration in Karzinomen führte bei histochemischen Untersuchungen zu einer intensiven Reaktion des Bindegewebes infiltrativ wachsender, maligner Tumoren. (GLENNER et al.; FISCHER). Das Ausmaß der Fermentaktivität soll nach MONIS et al. (1959) kein Zeichen für die Malignität des Tumors sein. Entgegengesetzter Meinung sind BURSTONE und FOLK

und auch BRAUN-FALCO (1957). Die Tumorzellen selbst zeigten nur in manchen Organen eine verstärkte Reaktion. Das Karzinom der Leber, der Brustdrüse, des Magens und des Gallengangs ließen hohe Leucin-Amino-peptidase-Aktivität erkennen (WILLIGHAGEN et al.). Die starke Reaktion des Magen-Karzinoms wurde von anderen Autoren nicht gefunden (GLENNER et al.; WATTENBERG; WACHSTEIN).

NACHLAS et al. (1957) beschrieben die Lokalisation der Leucin-Amino-peptidase im Ovarium des Meerschweinchens. Eine intensive Leucin-Amino-peptidase-Reaktion zeigte das Keimepithel, die Tunica albuginea, die Blutgefäße und die meisten Follikeln. Im Stroma waren einige Zellen besonders in der Umgebung der Follikel stark gefärbt.

Im Ovarium der Ratte wurde in intakten Follikeln meist keine, vereinzelt eine schwache Reaktion gefunden. Die Granulosa atretischer Follikel ließ eine sehr hohe Enzymaktivität erkennen. Das Ovum reagierte nur bei hochgradiger Atresie der Follikel. Eine mäßige Reaktion fand sich im Corpus luteum der 1. postovulatorischen Phase des Rattenovarium (ROSENBAUM). Die Gelbkörper der 2. Phase waren intensiv gefärbt, ältere zeigten nur eine geringe Fermentaktivität. In Schwangerschaftsgelbkörpern reagierte die perikapillären Makrophagen, weniger das Luteingewebe (ROSENBAUM et al.; LOBEL et al.).

FUHRMANN (1959) fand im menschlichen Ovarium eine positive Reaktion in der Theca von Bläschenfollikeln und von atretischen Follikeln. Die Granulosa schien inaktiv. Das Bindegewebe war nur schwach gefärbt. Die Thecaluteinzellen des Corpus luteum zeigten eine intensive Leucin-Amino-peptidase-Reaktion als die Granulosaluteinzellen. Auch NACHLAS et al. (1960) wiesen im menschlichen Ovarium eine hohe Fermentaktivität in der Theca interna junger Corpora lutea nach. Mit dem neuen Substrat fanden die Autoren bei der Ratte eine deutliche Reaktion des Follikelepithels, des Stromas und der kleinen Gefäße.
(s. Tabelle Nr. II, S. 41)

Tabelle Nr. II

Lokalisation der Leucin-Aminopeptidase im Ovarium

<u>Autor</u>	<u>Spezies</u>	<u>Substrat</u>	<u>Keim- epithel</u>	<u>Tunica alb.</u>	<u>Stroma</u>	<u>Gefäße</u>	<u>Epithel</u>	<u>Follikel</u>	<u>atret. Follikel</u>	<u>Corpus Lut.</u>	<u>Corpus Lut. Grav.</u>
NACHLAS et al. (1957)	Meerschwein- chen	L-Leucyl-β- Naphthylamid	++	++	(+)	++	++				
ROSENBAUM et al. (1960)	Ratte	L-Leucyl-β-					-/(+)		* ++ Ovum +	(+) 1. Gen. ++ 2. " (+) 3. "	(+)
LOBEL et al. (1961)											
FUHRMANN (1959)	Mensch	DL-Alanyl-β- Naphthylamid			(+)	-	-	+	+	Theca (+) Granulosa	
NACHLAS et al. (1960)	Ratte Mensch	L-Leucyl-4- Methoxy- Naphthylamid			+	+	+			++ Theca	
Eigene Untersuchung	Mensch	L-Leucyl- (4-Methoxy-) β-Naphthylamid	-	-	-	-/(+)	-	(+)	++ (Theca)	++ Theca - Gran.	(+)

* = Granulosa

Eigene Methodik

Die Leucin-Aminopeptidase wurde in 25 Ovarien, 6 Corpora lutea menstruationis und in 10 Corpora lutea graviditatis gesunder Frauen nach der Methode von NACHLAS et al. (1957) nachgewiesen.

Die stabile Vorratslösung bestand aus

8,0 mg L-Leucyl- β -Naphthyl-Hydrochlorid pro ml H₂O.

Sie wurde im Eisschrank aufbewahrt.

Inkubationslösung:

5,0 ml Vorratslösung

50,0 ml Azetatpuffer (0,1 m, pH 6,5)

40,0 ml physiologische Kochsalzlösung

5,0 ml Kaliumcyanidlösung (2mal 10⁻²m)

50,0 mg Echt Blau B (0,5 mg/ml).

Die unfixierten Kryostatschnitte wurden in dieser Lösung 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie 2 Minuten in physiologischer Kochsalzlösung gespült und zur Chelatbildung in eine 0,1 m Kupfersulfatlösung eingestellt. Nach 2 Minuten wurden die Präparate wieder in Kochsalzlösung gespült, in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (70%, 96%, 100% je 4 Minuten) und mit Diatex eingedeckt.

In einigen Präparaten wurden die Zellkerne mit Kern-Echtrot gefärbt. Ungefärbte Präparate zeigten nach der Inkubation eine leicht gelblichbraune Färbung, die durch Zersetzungsprodukte des Diazoniumsalzes bedingt war. An den fermentaktiven Stellen des Gewebes war das blaue Kupferchelate zu erkennen.

Außerdem wurde die Leucin-Aminopeptidase nach der neuen Methode von NACHLAS et al. (1960) nachgewiesen.

Die Vorratslösung bestand aus

4,0 mg L-Leucyl-4-Methoxy- β -Naphthylamid pro ml H₂O.

Die Inkubationslösung wurde wie in der oben angegebenen Methode hergestellt.

Die Kryostatschnitte wurden ohne Farbstoff inkubiert, da das Spaltprodukt auch ohne Kupplung mit dem Diazoniumsalz als feine, braune Granula unter dem Mikroskop gut sichtbar war.

Die Fermentlokalisation war nach beiden Methoden gleich. Eine verminderte Reaktion infolge Aktivitätsverlustes des Enzyms konnte an bis zu 4 Wochen im Kryostaten gelagerten Material nicht festgestellt werden.

Eigene Befunde

Im Oberflächenepithel und in der Tunica albuginea des Ovarium waren keine Farbstoffpartikel als Zeichen einer Leucin-Amino-peptidase-Aktivität nachweisbar.

Auch das Rinden- und Markgewebe zeigten keine Reaktion. In einigen Präparaten waren die Wände kleinerer Gefäße im Mark schwach gefärbt. Arterien und Arteriolen blieben reaktionslos.

Die Primärfollikel in der Rinde ließen in Eizelle und im Epithel keine Aktivität erkennen.

Die Sekundärfollikel wiesen in der Eizelle, in der Membrana granulosa und in den Zellen, die sich später zur Theca folliculi differenzieren, keine Reaktion auf.

Die Tertiärfollikel sind gekennzeichnet durch die Liquorbildung, die Zona pellucida und die Thecazellschicht. Die Mehrzahl dieser Follikel zeigten keine Fermentreaktion, auch im Liquor nicht. In einigen Tertiärfollikeln reagierte die Theca intensiv. In einem Fall war auch die Granulosa gefärbt.

In den reifen oder Graaf'schen Follikeln war eine deutliche, meist starke Fermentaktivität in der Thecaschicht erfaßbar. Die Granulosa reagierte schwach oder gar nicht. Der Cumulus oophorus, der Eihügel, unterschied sich nicht von der übrigen Granulosa. Die Theca dagegen reagierte an dieser Stelle sehr intensiv. Der Liquor blieb ohne Färbung. Ein gesprungener Follikel ließ eine intensive Reaktion der Thecazellen erkennen, die Granulosa reagierte nicht.

An den atretischen Primär- und Sekundärfollikeln wurde keine Färbung beobachtet.

Die meisten atretischen Tertiärfollikel ließen keine Aktivität erkennen. Nur wenige zeigten eine Reaktion in der

Theca. Bei vorgeschrittener Atresie, gekennzeichnet durch eine bindegewebige Ausfüllung des Liquorraumes, reagierten die Follikel nicht.

Die atretischen Graaf'schen Follikel wiesen eine intensive Reaktion der Thecazellen auf, die in der Umgebung des Eihügels am stärksten war. In einigen Fällen blieb die Theca ungefärbt. In der Follikelflüssigkeit und in der Granulosa war keine Fermentaktivität nachweisbar. Die geringe Färbung an einigen Stellen der Granulosa ist wahrscheinlich auf Diffusionsartefakte zurückzuführen. In den mit dem neuen Substrat inkubierten Schnitten wurden keine Granula des Reaktionsproduktes in der Granulosa gefunden.

Die Corpora atretica thecalia reagierten intensiv in der hyperplastischen Theca .

Im jungen Corpus luteum zeigten die Thecaluteinzellen eine intensive Fermentreaktion. Die Granulosaluteinzellen waren nur schwach gefärbt, manchmal vermehrt in der Umgebung einsprossender Kapillaren.

In etwa 3-8 Tage alten Gelbkörpern wurde eine starke Enzymaktivität in den Thecaluteinzellen beobachtet, während Granulosa, Gefäßwände und Bindegewebe keine Färbung aufwiesen.

In regressiven Corpora lutea menstruationis, zu erkennen an den Vacuolen im Cytoplasma und den pyknotischen Zellkernen, war die Reaktion wiederum besonders stark in der Theca. Auch die Granulosaluteinzellen zeigten eine mäßige Reaktion, die in der Umgebung der Kapillaren intensiv ausfiel.

Die Corpora albicantia, die vollständig rückgebildeten und bindegewebig organisierten Gelbkörper, ließen keine Aktivität erkennen.

Zwei Corpora lutea graviditatis von etwa 6 Wochen alten Schwangerschaften zeigten eine schwache Reaktion der Thecaluteinzellen. Granulosa und Bindegewebe reagierten nicht. In 3, 4 und 5 Monatealten Schwangerschaftsgelbkörpern konnte keine Leucin-Aminopeptidase nachgewiesen werden.

Ein Corpus luteum wurde bei einer Tubargravidität excidiert, nachdem 5 Wochen leichte Schmierblutungen bestanden hatten. In diesem Fall zeigte das Bindegewebe eine starke Reaktion, auch Granulosa, Theca und Gefäße waren gefärbt. Ein anderes Präparat von einer Tubargravidität mit leichter Blutung seit 3 Wochen ließ ebenfalls eine Fermentreaktion in allen Anteilen erkennen, allerdings schwächer.

Die Corpora lutea von Schnittenbindungen am Ende der Gravidität waren im Lutein- und Bindegewebe mäßig gefärbt. Die Fermentreaktion war in der Umgebung der Gefäße und am Rande des Luteingewebes am stärksten.

III. Carboanhydrase

Biochemie

Die Carboanhydrase gehört zu den Synthesen und Lyasen. Diese Fermente vereinigen zwei Substrate oder zerlegen ein Substrat in zwei Komponenten. Da die Carboanhydrase die Reaktion $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$ in beiden Richtungen beschleunigt, also sowohl eine Wasseraufnahme, als auch eine Wasserabgabe bewirkt, kann das Ferment zu den Hydratasen und Dehydratasen eingeordnet werden. Außerdem wirkt es als Carboxylase, da Kohlendioxyd aufgenommen bzw. abgegeben wird (HOFFMANN-OSTENHOF; GIBIAN).

HENRIQUES (1928) vermutete einen Katalysator im Blut, der die Kohlendioxydaufnahme und -abgabe beschleunigt, da die physikalischen Prozesse zu langsam ablaufen. Nach den Untersuchungen von BRINKMAN et al. (1932) schien das Hämoglobin als Katalysator zu wirken. MELDRUM und ROUGHTON (1932) gelang die Isolierung des Fermentes aus Erythrocyten. Noch in einer Verdünnung von 1:7 Millionen bei pH 7,0 wird die Geschwindigkeit der Kohlendioxydentwicklung aus Bikarbonat durch das Ferment auf das Doppelte erhöht. In den Erythrocyten aller Wirbeltiere ist eine starke Carboanhydrase-Aktivität vorhanden. Hohe Carboanhydrase Konzentration wird in den Organen gefunden, in denen Bestandteile des Kohlendioxyd-Kohlensäure-Puffer-Systems sezerniert oder resorbiert werden (RICHTERICH).

In der Niere und im Magen werden Wasserstoffionen sezerniert, dementsprechend wurde ein hoher Ferment Spiegel gefunden (DAVENPORT et al. 1938/41; ASHBY; DAVIES et al. 1948/52; DAVENPORT 1941).

Im Pankreas findet eine Bikarbonat-Sekretion statt. Hier wurde hohe Carboanhydrase-Aktivität nachgewiesen (VAN GOOR 1940; BIRNBAUM et al.). In der Prostata werden Bikarbonationen resorbiert, damit verbunden ist ein hoher Enzym Spiegel (DAVENPORT et al. 1941). Außerdem wurde starke Carboanhydrase-Aktivität in den Schweißdrüsen (BRAUN-FALCO

1955), in den Speicheldrüsen (SAND) und im Ciliarkörper (WISTRAND) gefunden, die ebenfalls auf eine Beteiligung an den Sekretionsvorgängen hinweist.

Die Carboanhydrase erhält die Wirkung des Kohlensäure-Bikarbonat-Puffers in der Zelle, sie ist von Bedeutung für das Säure-Basen Gleichgewicht (DAVIES et al. 1952; BERLINER et al.; RICHTERICH). Da Kohlendioxyd schneller als viele Ionen die Zellmembran passiert, wird durch die Fermentwirkung der effektive Ionenaustausch beschleunigt und die Konstanz der Ionen in der Zelle während der Sekretions- und Resorptionsprozesse bewahrt (KEILIN, MANN 1941).

Bei Zellfraktionierungen wurde der Hauptanteil der Carboanhydrase-Aktivität in der flüssigen Phase des Cytoplasmas gefunden. Die korpuskulären Bestandteile der Zelle (Kern, Mitochondrien, Mikrosomen) zeigten nur eine geringe Fermentaktivität (BAUMANN; GRAY et al.).

SCOTT et al. (1942) gelang die Kristallisation der Carboanhydrase mit Ammoniumhydroxyd. Das Enzym ist ein Zinkprotein mit einem Molekulargewicht von 30 000 (PETERMANN et al.) Der Zinkanteil wurde mit 0,3% angegeben (KEILIN, MANN 1940), andere Autoren fanden 0,15% und 0,5% Zink (SCOTT et al. 1941; HOVE et al.).

Das Zink kann durch Dialyse nicht abgetrennt werden (TUPPER et al.). Die Behandlung mit Dithizon, das mit Zink einen roten Farbstoff bildet, beeinflusst die Fermentaktivität nicht (HOVE et al.). Wahrscheinlich ist das Metall fest an das Enzymeiweiß gebunden (KEILIN, MANN 1940). Über die Art der Bindung und über die Funktion des Zink ist noch nichts bekannt. Die Carboanhydrase enthält 15,8% Stickstoff, 1,3% Cystin und 4,1% Tyrosin (SCOTT 1942).

Ein pH-Optimum der Fermentwirkung läßt sich nicht feststellen. Die Aktivität steigt zwischen pH 7,0 - pH 10,0 an. Unter pH 3,0 und über pH 13,0 ist keine Enzymreaktion mehr nachweisbar (ROUGHTON et al. 1946).

Die Carboanhydrase wird durch die Anionen vieler Neutralsalze gehemmt. Sie bilden einen inaktiven Komplex mit dem

Enzym. Chlor-, Brom-, Jod- und Nitrat-Ionen hemmen das Ferment bei pH 7,4 in einer molaren Konzentration von 0,02-0,1. Stärkere Inhibitoren sind die Schwermetallsalze von Kupfer, Silber, Gold und Quecksilber ($10^{-3}m$). Die Carboanhydrase wird durch oxydierende Substanzen wie Kaliumpermanganat gehemmt, außerdem durch Sulfid, Cyanid und Azid (ROUGHTON et al. 1946, 1951).

Einen enzymspezifischen Hemmstoff fanden MANN und KEILIN in den Sulfonamiden. Entscheidend für die Wirkung ist die unsubstituierte Sulfonamidgruppe ($-SO_2NH_2$). Sulfonamidbenzoesäure und Thiophen-2- Sulfonamid haben die 10fache Wirkung des einfachen Sulfonamids (KREBS). Heterocyklische Sulfonamide sind noch stärkere Inhibitoren (ROBLIN et al.; MILLER et al.). Besondere Bedeutung hat das DIAMOX (2-Acetyl-amino-1,3,4-thiadiazol-5-sulfonamid) gewonnen, das 60-300mal wirksamer ist als Sulfanilamid und in einer Konzentration von 10^{-5} - $10^{-6}m$ die Carboanhydrase völlig inaktiviert (MAREN et al.).

Nach intravenösen Gaben von DIAMOX nimmt beim Hund die Bikarbonatsekretion des Pankreas ab (BIRNBAUM et al.). Die Säureproduktion des Hundemagens wird deutlich gemindert (JANOWITZ et al.). In der Niere ist die Rückresorption von Natrium- und Bikarbonat-Ionen aus dem tubulären Urin gestört, die Kalium-Ionen Ausscheidung ist erhöht (BERLINER et al. 1951).

BOOTH (1936/38) fand im Plasma einiger Säuger einen spezifischen Inhibitor, der zur Pseudoglobulinfraktion gehört. Aktivatoren der Carboanhydrase sind nicht bekannt. Die Aktivitätssteigerung, die durch Pepton hervorgerufen wird, ist auf einen Stabilisatoreffekt zurückzuführen (SCOTT et al. 1942). Die gleiche Wirkung wird durch Zusatz von Insulin oder Blutserum erreicht.

Der Einfluß von Sexualhormonen auf die Carboanhydrase im Endometrium und im Gesamtuterus wurde von einigen Autoren untersucht. Eine Abhängigkeit der Carboanhydrase-Aktivität des Kaninchenendometrium von der Progesteronbildung im

Gelbkörper ist von LUTWAK-MANN et al. (1955/57) beschrieben worden. Durch Progesterongaben wurde ein Aktivitätsanstieg hervorgerufen (OGAWA et al. 1961). OGAWA et al. (1962), fanden eine lineare Beziehung zwischen Progesterondosis und Fermentaktivität. Es wird die Möglichkeit einer Messung der Progesteronaktivität diskutiert. Im Gegensatz dazu könnte der Abfall der Endometrium-Carboanhydrase der Ratte nach Oestradiolgaben für eine Aktivitätsmessung dieses Hormons ausgewertet werden (BIALY et al.). Bei Ratte und Maus wird das Ferment hier durch Progesteron nicht beeinflusst (MADJEREK et al.; OGAWA et al. 1961/62).

Histochemie

Die erste histochemische Methode zum Nachweis der Carboanhydrase wurde von KURATA (1953) entwickelt. Dünne Gewebestücke wurden eine Stunde in kaltem Azeton fixiert und in einer Lösung aus Manganchlorid und 8%igem Natriumbikarbonat 30-45 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Carboanhydrase beschleunigt die Reaktion



Anschließend wurde das Gewebe eine Stunde in Aqua dest. gespült, in Alkohol dehydriert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Die Präparate wurden mit einer 0,1%igen Kaliumperjodatlösung behandelt, um das Reaktionsprodukt als braunes Präzipitat sichtbar zu machen. An Stelle des Manganchlorid wurde auch Nickel-, Kobalt- und Calciumchlorid benutzt.

Nachuntersucher erhielten unbefriedigende Ergebnisse. Die Präparate zeigten eine diffuse Fällung, die die Fermentlokalisation erschwerte (GOEBEL, PUCHTLER; BRAUN-FALCO 1955; HÄUSLER; CARMICHAEL et al.).

Die Ergebnisse wurden durch die Inkubation von Gewebeschnitten verbessert, sie waren aber noch nicht befriedigend (GOEBEL, PUCHTLER; BRAUN-FALCO 1956a). Von den Nachuntersuchern wurde Kobaltchlorid anstatt Manganchlorid benutzt. Durch die Fermentwirkung entstand das schwer lös-

liche Kobaltkarbonat. Dieses wurde durch die Behandlung der Präparate mit Ammoniumsulfid als gut sichtbares, schwarzes Kobaltsulfid ausgefällt.

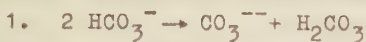
Die Gewebeschnitte zeigten eine diffuse gelbliche Färbung, die auf die Anlagerung von Kobalt an unvollständig fixiertes Eiweiß zurückgeführt wurde. PEARSE (1960) fand bei dem Fermentnachweis die Präparate von einem feinen oder gröberen Präzipitat bedeckt. Auch inaktivierte Kontrollschnitte zeigten eine positive Reaktion. Die Inkubation ohne Bikarbonat führte ebenfalls zu einer Färbung der Präparate.

Die Hemmung der Reaktion durch DIAMOX gelang erst, wenn 500 mg des Inhibitors in der Inkubationslösung enthalten waren (PUCHTLER et al.). BRAUN-FALCO et al. (1955) konnten die Reaktion in der Niere durch Kaliumcyanid hemmen, jedoch nicht durch DIAMOX. Dieser Befund ist vielleicht auf die reversible Wirkung des DIAMOX zurückzuführen, die während der Bebrütungszeit nicht erhalten bleibt. Außerdem ist das von den Autoren benutzte DIAMOX schwer wasserlöslich. HÄUSLER verwandte das lösliche Natriumsalz des DIAMOX in einer Konzentration von 4-6mal 10^{-3} m. Die Gewebereaktion und auch die gereinigte Carboanhydrase (CARTASE-SCHERING) wurden vollständig gehemmt.

Die von KURATA angegebene Lösung blieb bei längerer Inkubationszeit nicht klar und mußte erneuert werden. Durch Zugabe von 0,1 m Natriumsulfat war die Inkubationslösung 5-6 Stunden stabil (HÄUSLER). Dadurch wurden unspezifische Fällungen ausgeschaltet. Die Lösung enthielt außerdem 0,1 m Kobaltsulfat, 0,05 m Schwefelsäure und Natriumbikarbonat. Es wurde Kobaltsulfat an Stelle des -chlorid benutzt, da Chlor-Ionen die Carboanhydrase-Aktivität bis zu 50 % hemmen.

HÄUSLER beobachtete nur eine Reaktion, wenn die Gewebeschnitte an der Oberfläche der Inkubationslösung schwammen. Das bei der Reaktion entstandene Kohlendioxyd mußte entweichen, da es die Bildung des Kobaltkarbonat beeinträchtigte.

Der Reaktionsablauf wurde folgendermaßen dargestellt:



Das durch die Carboanhydrase-Wirkung (CAH) entstehende Kohlendioxyd entweicht, und das Gleichgewicht der 1. Reaktion wird nach rechts verschoben. Es entstehen vermehrt Karbonat-Ionen, die durch die in der Lösung vorhandenen Kobalt-Ionen ausgefällt werden.

Fixierungsstudien ergaben, daß nach einstündiger Vorbehandlung des Gewebes mit Azeton die Inkubationszeit kürzer war als nach Methanolfixierung. Stärker wurde die Enzymreaktion durch Äthanol und WOLMAN's Fixativ (Äthanol und Essigsäure) beeinträchtigt. Formalin verminderte die Carboanhydrase-Aktivität nicht mehr als Azeton. Jedoch wurden an formalinfixierten Präparaten unspezifische Fällungen beobachtet, außerdem zeigten die Präparate eine starke Braunfärbung des Gewebes durch Anlagerung von Kobalt an Eiweiß (HÄUSLER).

FAND et al. (1959) prüften die Spezifität des histochemischen Carboanhydrase-Nachweises. Biochemisch wurde die Carboanhydrase-Aktivität in den Acini des Pankreas gefunden, während sich bei dem histochemischen Nachweis die Inselzellen färbten, die Zink enthalten. Die Schwärzung dieser Zellen führte zu der Vermutung, daß der Kobaltsulfidniederschlag nicht auf Fermentaktivität, sondern auf der Anwesenheit von Zink beruhte. In Modellversuchen wurden divalente Metallionen (Zink, Mangan, Cadmium) in Gelatinelösung auf Objektträgern in der KURATA'schen Bebrütungslösung inkubiert. Die Reaktion war an den metallhaltigen Stellen der Objektträger stark positiv (MUSTAKALLIO et al. 1960).

Ebenso wird die Färbung der Gewebeschnitte auf die Anwesenheit divalenter Kationen zurückgeführt, die mit dem Karbonat nach Überschreiten des Löslichkeitsproduktes ausfallen. Die Kationen werden durch das Kobalt der Inkubationslösung ersetzt. Die Reaktion beruht demnach nicht auf der Aktivität der Carboanhydrase, sondern auf hohen Konzentrationen divalenter Kationen.

Die Frage der Spezifität des histochemischen Carboanhydrase-Nachweises ist nicht entschieden.

KURATA beobachtete mit der von ihm entwickelten Methode eine positive Reaktion in den Erythrocyten, in den Belegzellen der Magenschleimhaut und in den Nierentubuli. (WACHSTEIN 1955). BRAUN-FALCO (1956a) und HÄUSLER fanden die stärkste Reaktion in der Pars recta der proximalen Nierentubuli, die Sammelröhren blieben ungefärbt. Eine intensive Schwärzung zeigte das Stratum basale und die sekretorischen Epithelien der ekkrinen Schweißdrüsen der Haut (BRAUN-FALCO 1955). Im Augengewebe der Ratte waren Iris und Ziliarkörper stark gefärbt (CARMICHAEL et al.).

Die histochemischen Befunde wurden durch biochemische Untersuchungen bestätigt, die hohe Fermentaktivität in der Niere, im Magen und im Ziliarkörper ergaben (DAVENPORT et al. 1938, 1941; WISTRAND).

LUTWAK-MANN und ADAMS (1957) untersuchten Ovarien von Kaninchen. Eine mäßige Carboanhydrase-Aktivität war im Luteingewebe zu erkennen, das übrige Ovarialgewebe zeigte bei biochemischen Versuchen keine Reaktion. Das Schafovarium reagierte auch nur im Luteingewebe. Histochemisch fand ARVY (1960) nach der Methode von KURATA eine positive Reaktion in allen Follikelzellen und im Liquor folliculi des Kaninchenovarium.

Biochemische oder histochemische Untersuchungen der Carboanhydrase-Aktivität im menschlichen Ovarium sind in der Literatur nicht mitgeteilt worden.

Eigene Methodik

Die Histopochemie der Carboanhydrase wurde in 19 Ovarien, 2 Corpora lutea menstruationis und 8 Corpora lutea graviditatis untersucht.

Methode von KURATA in der Modifikation von GOEBEL und PUCHTLER.

Die Kryostatschnitte wurden 1 Stunde in reinem Azeton bei 6°C fixiert und nach einer Spülung mit Aqua dest. für

1 Stunde bei 37°C in die Inkubationslösung eingestellt.

Die Bebrütungslösung wurde aus

100,0 ml 8%igem NaHCO_3 und

1,0 g CoCl_2

frisch bereitet und filtriert.

Nach der Inkubation wurden die Präparate 2 Minuten in Aquadest. gespült und 1/2-1 Minute in eine

4%ige Ammoniumsulfidlösung eingestellt. Hierdurch wurde das an Stellen der Enzymaktivität ausgefallene Kobaltkarbonat als schwarzes Kobaltsulfid sichtbar. Die Bildung des Sulfids erfolgte sehr rasch, weshalb die kurze Reaktionszeit ausreichend war (HÄUSLER). Die diffuse Färbung der Präparate wurde dadurch vermindert. GOEBEL und PUCHTLER behandelten die Präparate 5 Minuten mit Ammoniumsulfidlösung.

Anschließend wurden die Kryostatschnitte gründlich gespült, in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (70%, 96%, 100% je 4 Minuten) und mit Diatex eingedeckt. Die Kerne wurden mit Mayer's Haemalaun gefärbt.

Die Inkubationslösung zeigte nach der Bebrütung eine geringe Trübung. Die Lösung war unverändert, wenn anstatt Kobaltchlorid Kobaltsulfat benutzt wurde. HÄUSLER verwandte Kobaltsulfat für den Carboanhydrase-Nachweis, da Chlor-Ionen in einer Konzentration von 0,01-0,1 m die Fermentreaktion bis zu 50% hemmen (ROUGHTON 1951).

Die Reaktion wurde durch Zusatz von 500,0 mg DIAMOX-Paracental LEDERLE, dem löslichen Natriumsalz des spezifischen Carboanhydrase Inhibitors, zur Inkubationslösung deutlich gemindert. Allerdings war an einigen Stellen immer noch ein schwarzer Niederschlag zu finden.

Die Inkubation der Präparate ohne Kobaltsulfat führte zu keiner Reaktion.

Zunächst wurden für die Versuche frei flottierende Kryostatschnitte benutzt. Da durch die Manipulationen das Gewebe teilweise zerstört wurde, waren die Präparate nur schwer zu beurteilen. Deshalb wurden die Gewebeschnitte vor der Inkubation auf Objektträger montiert. Ein Unterschied in der

Färbung konnte nicht festgestellt werden.

Carboanhydrase-Nachweis nach HÄUSLER

Frei flottierende Kryostatschnitte wurden 1 Stunde in kaltem Azeton fixiert.

Inkubationslösung: .

A. 1,0 ml 0,1 m CoSO_4 .
6,0 ml 0,05 m H_2SO_4 .

B. 1,0 g NaHCO_3
50,0 ml 0,1 m Na_2SO_4 .

Vor der Inkubation wurde die stabile Lösung A über die frischbereitete Lösung B gegossen. Die Bebrütung dauerte 2 Stunden bei 20°C , wobei die Präparate an der Oberfläche der Inkubationslösung schwammen.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte in Aqua dest. gespült und 1 Minute in eine Ammoniumsulfidlösung gebracht. Danach wurden die Präparate in Leitungswasser gespült und auf Objektträger montiert. Nach der Kernfärbung mit Mayer's Haemalaun wurden die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Diatex eingedeckt.

Eine Reaktion konnte in keinem Präparat festgestellt werden.

Zinknachweis nach FAND et al.

Zink bildet mit Dithizon einen roten Farbstoff.

Es wurden unfixierte Kryostatschnitte auf eine Färbepbank gebracht und mit einer Dithizonlösung behandelt.

Sie bestand aus

10,0 mg Dithizon
100,0 ml reines Azeton.

In einer Verdünnung von 1,5:1 mit Aqua dest. wurde die Lösung direkt auf das Gewebe gegeben. Wenn sich die klare, dunkelgrüne Lösung gelb färbte, wurde sie erneuert.

Nach einer Färbezeit bis zu 20 Minuten wurden die Schnitte in Chloroform gespült und in nassem Zustand unter dem Mikroskop betrachtet.

Ein Niederschlag roter Farbstoffgranula wurde nicht beobachtet. Es ist wahrscheinlich, daß mit Dithizon das Zink der Carboanhydrase nicht nachgewiesen werden kann, da das Metall fest an das Enzymeiweiß gebunden zu sein scheint (HOVE).

Auch FAND et al. konnten das Zink des Fermentes nicht darstellen. In der Niere, die eine hohe Carboanhydrase-Aktivität aufweist, wurde keine Färbung beobachtet. Im Pankreas färbten sich nur die zinkhaltigen Inselzellen.

Eigene Befunde

Alle Präparate zeigten einen diffusen Niederschlag schwarzer Farbstoffpartikel, der über der Schnittebene lag. Da die Inkubation mit dem Inhibitor DIAMOX noch zu einer geringen Färbung der Schnitte führte, die wahrscheinlich auf einer unspezifischen Fällung beruht, wurden die Präparate nach dem Vergleich der mit und ohne DIAMOX inkubierten Kryostatschnitte ausgewertet.

Das Oberflächenepithel zeigte einen deutlichen Niederschlag schwarzer Farbstoffpartikel.

Die Tunica albuginea enthielt kein Präzipitat.

Im Rinden- und Markgewebe fand sich kein schwarzer Niederschlag.

Die größeren Gefäße des Hilus zeigten eine deutliche Reaktion in der Intima. An den Arteriolen wurde keine Präzipitation gefunden, während die Kapillärwände intensiv reagierten. Auch die kleineren Venen zeigten einen Farbstoffniederschlag in der inneren Wandschicht.

Die intakten Primärfollikel reagierten nicht.

Die meisten Sekundärfollikel zeigten keine Reaktion, nur vereinzelt war im Follikelepithel ein Niederschlag zu erkennen.

Die Tertiärfollikel reagierten deutlich in der Granulosa. Die Thecazellschicht und der Liquor wiesen kein Präzipitat auf.

Die Graaf'schen Follikel zeigten eine intensive Enzymreaktion in der Granulosa, auch einige Stellen der Theca reagierten. Der Liquor folliculi war mäßig gefärbt, allerdings auch in den mit DIAMOX inkubierten Präparaten.

Die meisten atretischen Primärfollikel ließen im Epithel einen deutlichen Farbstoffniederschlag erkennen. In einigen Fällen reagierte auch die Eizelle. Nur wenige Follikel blieben ohne Reaktion.

Die rückgebildeten Sekundärfollikel wiesen in einigen Fällen einen Kobaltsulfidniederschlag im Epithel auf. Die Eizelle reagierte nicht.

Die atretischen Tertiär- und Graaf'schen Follikel zeigten bis auf wenige Ausnahmen eine intensive Reaktion der Granulosa. Die Thecaschicht wies in einigen Fällen einen dichten Niederschlag auf, in anderen Follikeln war nur eine schwache Präzipitation zu erkennen. In den Follikeln mit teilweise bindegewebig ausgefülltem Liquorraum wurde keine Reaktion der Theca beobachtet. Die Schwärzung des Liquors wurde durch DIAMOX deutlich gemindert.

Die Corpora atretica thecalia zeigten eine dichte Ablagerung der Farbstoffpartikel.

Die Corpora lutea menstruationis reagierten 2-3 Tage nach der Ovulation intensiv in den Luteinzellen. An den Gefäßwänden war eine deutliche Ablagerung nachweisbar. Die Reste des Liquorraumes ließen eine leichte Schwärzung erkennen. An etwas älteren Gelbkörpern zeigten schwarze Streifen den Verlauf der Kapillaren, die sich von dem weniger geschwärzten Luteingewebe abhoben. Die Bindegewebssepten zeigten eine geringe Präzipitation.

Die Fermentaktivität war in den Theca- und Granulosaluteinzellen und im Bindegewebe teilweise rückgebildeter Corpora lutea deutlich schwächer als in den Gelbkörpern des Blütestadium. Die Kapillarwände ließen noch eine starke Reaktion erkennen.

In den Corpora albicantia zeigten die Makrophagen und die Gefäße eine deutliche Reaktion. Das rückgebildete Luteingewebe und das Bindegewebe reagierten nicht.

In den Corpora lutea graviditatis des 1. Trimenon wurde im Luteingewebe ein dichter Niederschlag von Kobaltsulfidpartikeln gefunden. An einigen Stellen schien die Fermentreaktion in den Thecaluteinzellen stärker als in der Granulosa. Im Bindegewebe und an den Gefäßen wurde eine dichte Ablagerung beobachtet.

Deutlich geringer war die Enzymaktivität in Corpora lutea vom 5.-6. Schwangerschaftsmonat und am Ende der Gravidität. Das Luteingewebe zeigte nur noch eine mäßige Reaktion, auch Bindegewebe und Gefäße wiesen nur eine geringe Präzipitation auf.

IV. Vergleich der Befunde der Literatur mit den eigenen Ergebnissen

=====

In der Literatur sind nur wenige Untersuchungen über Fermente im Ovarium mitgeteilt worden. Die Befunde wurden meist an Eierstöcken von Tieren erhoben. Ovarien vom Menschen wurden selten untersucht. Biochemische Untersuchungen der β -Glucuronidase-Aktivität am menschlichen Ovarium ergaben mit verschiedenen Substraten unterschiedliche Befunde. Phenolphthaleinglucuronid wurde vom Ovarialgewebe rasch gespalten (FISHMAN et al. 1947). Mit demselben Substrat fanden LEVY et al. (1961) hohe Fermentaktivität im Corpus luteum, schwache im übrigen Ovarium. RUTENBURG et al. (1953) konnten mit 8-Benzoylamino-2-Naphthylglucuronid keine β -Glucuronidase im Ovarium nachweisen. Das Substrat zum β -Galactosidase Nachweis, Nitrophenylgalactosid, wurde vom Corpus luteum sehr rasch, vom übrigen Ovarialgewebe nur langsam gespalten. Mit 6-Brom-2-Naphthylgalactosid war keine β -Galactosidase-Aktivität nachweisbar (COHEN et al. 1952). Die Carboanhydrase wurde biochemisch im Ovarien von Kaninchen und Schafen untersucht (LUTWAK-MANN 1957). Das Luteingewebe zeigte eine mäßige Aktivität, das übrige Gewebe reagierte nicht.

Die histochemischen Untersuchungen der β -Glucuronidase im Ovarium wurden an Organen der Ratte durchgeführt (SELIGMAN et al. 1954; FISHMAN und BAKER 1956). Die histochemische Lokalisation der β -Galactosidase im Ovarium ist in der Literatur nicht mitgeteilt worden. Die Leucin-Amino-peptidase wurde außer im Eierstock der Ratte (ROSENBAUM et al. 1960; LOBEL et al. 1961; NACHLAS et al. 1960), beim Meerschweinchen (NACHLAS et al. 1957) und beim Menschen (FUHRMANN 1959; NACHLAS et al. 1960) nachgewiesen. Die Carboanhydrase wurde histochemisch im Kaninchenovarium untersucht (ARVY 1960).

Die vorliegende Untersuchung ergibt eine Übersicht der Lokalisation der Fermente β -Glucuronidase, β -Galactosidase, Leucin-Amino-peptidase und Carboanhydrase in den verschiedenen Strukturen des menschlichen Eierstocks.

Vergleichend werden die eigenen Befunde in Parallele zu den Ergebnissen der Literatur in den Formationen des Ovarium zusammengestellt.

Das Keim- oder Oberflächenepithel des Rattenovarium zeigte nach der Eisen-Hydroxychinolin Methode von FISHMAN und BAKER starke β -Glucuronidase-Aktivität. Diese Reaktion führte auch im menschlichen Ovarium zu einer intensiven Färbung des Oberflächenepithels. Dagegen war nach der Azofarbstoff-Methode von SELIGMAN et al. keine Fermentaktivität in diesen Zellen zu erkennen. β -Galactosidase wurde hier nicht gefunden. Der Leucin-Aminopeptidase Nachweis ergab beim Meerschweinchen eine hohe Aktivität des Keimepithels. Die eigenen Untersuchungen dagegen führten mit demselben Substrat zu keiner Reaktion des Oberflächenepithels. Eine deutliche Carboanhydrase-Reaktion wurde hier beobachtet.

In der Tunica albuginea waren β -Glucuronidase und β -Galactosidase nicht nachweisbar. NACHLAS et al. fanden beim Meerschweinchen eine starke Leucin-Aminopeptidase-Aktivität in dieser Zellschicht. Am menschlichen Ovarium wurde in den vorliegenden Untersuchungen keine Leucin-Aminopeptidase-Reaktion gefunden. Auch Kobaltsulfidpartikel als Zeichen einer Carboanhydrase-Aktivität waren in der Tunica albuginea nicht vorhanden.

Rinden- und Markgewebe zeigten eine mäßige β -Glucuronidase-Reaktion. In den nach der Methode von SELIGMAN et al. behandelten Präparaten blieben diese Strukturen ungefärbt. In der Literatur wird keine β -Glucuronidase-Aktivität in Rinde und Mark der Rattenovarien beschrieben. β -Galactosidase war hier nicht nachzuweisen. Im Meerschweinchenovarium zeigte das Stroma schwache Leucin-Aminopeptidase-Aktivität, bei der Ratte wurde hier eine deutliche Reaktion beobachtet. FUHRMANN beschrieb eine sehr schwache Reaktion im Bindegewebe des menschlichen Ovarium. Er benutzte als Substrat DL-Alanyl- β -Naphthylamid. Diese Untersuchungen können den Befund nicht bestätigen. Leucin-Aminopeptidase

war mit L-Leucyl- β -Naphthylamid in Mark und Rinde nicht nachweisbar.

β -Glucuronidase und β -Galactosidase wurden in den Gefäßen nicht gefunden. Schwache Leucin-Aminopeptidase-Aktivität zeigten nur einige Gefäße im Mark. Beim Meerschweinchen dagegen wurde eine intensive Reaktion der Gefäße beobachtet. Auch bei der Ratte war eine deutliche Aktivität zu erkennen. Die Hilusgefäße zeigten eine starke Carboanhydrase-Reaktion der Intima, auch an den Kapillarwänden war eine erhebliche Fermentaktivität vorhanden.

In den Primärfollikeln des Rattenovarium fanden SELIGMAN et al. mit der Azofarbstoffmethode eine schwache β -Glucuronidase-Reaktion im Epithel, während FISHMAN und BAKER eine intensive Reaktion des Follikelepithels und der Eizelle beschrieben. Im menschlichen Ovarium konnte keine β -Glucuronidase-Aktivität im Follikelepithel nachgewiesen werden. Der Kern der Eizelle reagierte nicht; während das Eiplasma in einigen Fällen eine deutliche Reaktion zeigte. β -Galactosidase-Aktivität war in den meisten Primärfollikeln nicht erfaßbar. Nur in einigen Follikeln führte der Fermentnachweis zu einer schwachen Färbung des Kerns der Eizelle. ROSENBAUM et al. fanden keine oder nur geringe Leucin-Aminopeptidase-Aktivität in intakten Follikeln des Rattenovarium. NACHLAS dagegen beobachtete eine deutliche Reaktion der Follikel. Beim Meerschweinchen wurde ebenfalls eine hohe Fermentaktivität im Follikelepithel nachgewiesen. Bei diesen Untersuchungen konnte keine Leucin-Aminopeptidase in den Primärfollikeln festgestellt werden. Auch von FUHRMANN wurde keine Färbung der Primärfollikel im menschlichen Ovarium beschrieben.

Der Carboanhydrase-Nachweis von KURATA führte zu einem schwarzen Niederschlag in allen Follikelzellen des Kaninchenovarium (ARVY). In den vorliegenden Untersuchungen mit der von GOEBEL und PUCHTLER modifizierten KURATA'schen Methode konnte im menschlichen Ovarium keine Carboanhydrase-Aktivität in den Primärfollikeln nachgewiesen werden. Auch die meisten Sekundärfollikel reagierten nicht. Nur

in einigen Fällen wurde ein Niederschlag in den Epithelzellen gefunden.

In der Literatur wurden die einzelnen Stadien der Follikelreifung nicht genügend beschrieben. Im menschlichen Ovarium konnte in den Sekundärfollikeln β -Glucuronidase, β -Galactosidase und Leucin-Amino-peptidase nicht nachgewiesen werden.

Die reifen Follikel im Ovarium der Ratte zeigten nach der Eisen-Hydroxychinolin Methode (FISHMAN und BAKER) deutliche β -Glucuronidase-Aktivität in Granulosa und Theca, während nach der Azofarbstoff-Methode (SELIGMAN et al.) die Reaktion in der Theca schwächer ausfiel. Im menschlichen Ovarium blieb die Granulosa der Tertiärfollikel und eines gesprungenen Follikels ungefärbt, die Theca zeigte wie bei der Ratte deutliche β -Glucuronidase-Aktivität. Der Liquor war schwach gefärbt. Bei der Ratte dagegen wurde keine β -Glucuronidase-Reaktion im Liquorraum beobachtet. Eine mäßige β -Galactosidase-Reaktion wurde in den Thecazellen gefunden. Die Theca ließ außerdem hohe Leucin-Amino-peptidase-Aktivität erkennen. Die Färbung war in der Umgebung des Eihügels am stärksten. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von FUHRMANN, der eine deutliche Leucin-Amino-peptidase-Reaktion der Theca folliculi des menschlichen Ovarium beschrieb, während die Granulosa keine Fermentaktivität zeigte. Diese Untersuchungen ergaben in einigen Fällen eine schwache Färbung der Granulosa, die wahrscheinlich auf Diffusionsartefakte zurückzuführen ist, denn in diesen Zellen war das Spaltprodukt des neuen Substrats (L-Leucyl-4-Methoxy- β -Naphthylamid) nicht nachweisbar. Der Liquor folliculi zeigte keine Leucin-Amino-peptidase-Aktivität. Carboanhydrase ist wahrscheinlich im Liquor nicht vorhanden, da die Schwärzung noch in den mit dem spezifischen Hemmstoff DIAMOX inkubierten Kontrollschnitten zu erkennen war. ARVY fand ebenfalls eine Farbstoffablagerung im Liquor des Kaninchenovarium. Außerdem zeigte die Granulosa der Follikel eine deutliche Carboanhydrase-Reaktion, die auch bei diesen Untersuchungen gefunden wurde. Die Thecazellen ließen eine geringe Präzipitation erkennen.

Einige atretische Primärfollikel zeigten im Plasma der Eizelle β -Glucuronidase-Aktivität. Schwache β -Galactosidase-Reaktion war nur in einigen Kernen der Eizelle zu erfassen. Leucin-Amino-peptidase wurde in atretischen Primär- und Sekundärfollikeln nicht gefunden. Dagegen war in diesen Follikeln im Epithel und auch in der Eizelle eine deutliche Carboanhydrase-Reaktion vorhanden.

Die atretischen Graaf'schen Follikel wiesen bei den vorliegenden Untersuchungen eine intensive β -Glucuronidase-Reaktion in der Thecazellschicht auf. Die Granulosa reagierte schwach oder gar nicht. Der β -Glucuronidase-Nachweis von FISHMAN und BAKER führte zu einer dichten Ablagerung von Berliner Blau im Liquorraum. Allerdings wurde keine Färbung des Liquors in den nach der Methode von SELIGMAN et al. inkubierten Präparaten beobachtet. Das Verhalten der atretischen reifen Follikel des Rattenovarium wurde in der Literatur nicht beschrieben. β -Galactosidase-Aktivität wurde in den Thecazellen gefunden. In der Granulosa und im Liquor konnte das Ferment nicht nachgewiesen werden. Starke Leucin-Amino-peptidase-Aktivität lag in der Granulosa atretischer Follikel des Rattenovarium vor, während im menschlichen Ovarium in dieser Schicht keine oder nur eine schwache Reaktion gefunden wurde. Auch die Eizelle, die im Rattenovarium in hochgradig atretischen Follikelngefärbt war, reagierte bei diesen Untersuchungen nicht. Im menschlichen Ovarium zeigte die Thecaschicht starke Leucin-Amino-peptidase-Aktivität. Dieser Befund wurde auch von FUHRMANN erhoben. In der Granulosa lag eine hohe Carboanhydrase-Aktivität vor, während die Theca in den meisten Fällen eine etwas schwächere Reaktion zeigte.

In den Corpora atretica thecalia wurde hohe β -Glucuronidase- und β -Galactosidase-Aktivität gefunden. Auch der Leucin-Amino-peptidase-Nachweis führte zu einer intensiven Reaktion. Ein schwarzer Niederschlag wurde durch die Carboanhydrase-Reaktion hervorgerufen. In der Literatur wurde das Verhalten der Corpora atretica thecalia nicht mitgeteilt.

Das Corpus luteum menstruationis der Ratte zeigte eine intensive β -Glucuronidase-Reaktion im Luteingewebe. Auch in menschlichen bis zu 10 Tage alten Gelbkörpern wurde bei den vorliegenden Untersuchungen hohe β -Glucuronidase-Aktivität gefunden. Nach der Menstruation fiel die Fermentreaktion im Luteingewebe deutlich schwächer aus. Die β -Galactosidase-Reaktion führte ebenfalls zu einer intensiven Färbung des Luteingewebes, die in älteren Gelbkörpern vermindert war. Diese Befunde werden durch die biochemisch nachgewiesene hohe Glykosidasen-Konzentration im Corpus luteum bestätigt (LEVY et al. 1961). Starke Leucin-Amino-peptidase-Aktivität lag in den Thecaluteinzellen vor, die auch von FUHRMANN und NACHLAS et al. (1960) gefunden wurde. Die Granulosaluteinzellen zeigten nur im Vaskularisationsstadium und in älteren Gelbkörpern eine schwache Fermentreaktion. In den Theca- und Granulosaluteinzellen war deutliche Carboanhydrase-Aktivität zu erfassen. Die höchste Intensität der Reaktion wurde an den Gefäßwänden beobachtet. Nach der Menstruation war der schwarze Niederschlag im Luteingewebe wesentlich geringer.

Die Corpora albicantia ließen keine β -Glucuronidase-Aktivität erkennen. Durch die β -Galactosidase-Reaktion wurden nur die Makrophagen gefärbt. Leucin-Amino-peptidase war nicht nachzuweisen. Eine deutliche Carboanhydrase-Reaktion wurde an den Gefäßwänden und in den Makrophagen beobachtet.

Die Corpora lutea graviditatis des 1. Trimenon zeigten eine intensive β -Glucuronidase- und β -Galactosidase-Reaktion im gesamten Luteingewebe. Ein Unterschied in der Farbtintensität im Vergleich mit den Corpora lutea menstruationis war nicht festzustellen. Dies entspricht der biochemisch gefundenen gleich hohen Glykosidasen-Aktivität in den Gelbkörpern trächtiger und nicht trächtiger Tiere (LEVY et al. 1961). Deutlich schwächer fiel die Fermentreaktion im Luteingewebe am Ende der Schwangerschaft aus. An einigen Stellen zeigte das Bindegewebe

geringe β -Glucuronidase-Reaktion. In den Corpora lutea graviditatis der Ratte fanden LOBEL et al. eine schwache Leucin-Amino-peptidase-Aktivität im Luteingewebe. Auch die menschlichen Schwangerschaftsgelbkörper des 1. Trimenon zeigten bei diesen Untersuchungen nur eine schwache Reaktion der Thecaluteinzellen. In der Granulosa war keine Fermentaktivität erfaßbar. Dagegen reagierten zwei Gelbkörper von länger abgestorbenen Tubargraviditäten deutlich im gesamten Luteingewebe und auch im Bindegewebe. In den Corpora lutea von Schnittentbindungen am Ende der der Gravidität wurde Leucin-Amino-peptidase-Aktivität im Binde- und Luteingewebe beobachtet. Die Carboanhydrase-Aktivität des Luteingewebes war am Ende der Schwangerschaft gegenüber den Corpora lutea des 1. Trimenon stark vermindert. Eine deutliche Reaktion wurde noch an den Gefäßwänden beobachtet.

(s. Tabellen Nr. I - Nr. III, S. 16, S. 41, S. 73).

Der Vergleich der histochemischen Methoden (s. Tabelle Nr. IV, S. 74) ergibt, daß die Azofarbstoff-Reaktion nach SELIGMAN et al. zum Nachweis der β -Glucuronidase zu einer schwächeren Färbung der fermentaktiven Strukturen führte als die Eisen-Hydroxychinolin-Methode von FISHMAN und BAKER und die Reaktion von BURTON und PEARSE. In diesen beiden Methoden wurde als Substrat 8-Hydroxychinolinglucuronid benutzt, das möglicherweise rascher durch die β -Glucuronidase gespalten wird als das von SELIGMAN et al. benutzte 6-Brom-2-Naphthylglucuronid. Auch im Rattenovarium ergab die Reaktion von SELIGMAN et al. eine schwächere Färbung als die von FISHMAN und BAKER. Ungeklärt ist die nur nach der Eisen-Hydroxychinolin-Methode beobachtete intensive Reaktion des Oberflächenepithels des Ovarium. Die Reaktion von BURTON und PEARSE führte in einigen Präparaten zu einer diffusen Färbung, wodurch die Ferment-lokalisation erschwert war.

Die Spaltung des L-Leucyl- β -Naphthylamid und des L-Leucyl-4-Methoxy- β -Naphthylamid ergab eine übereinstimmende Lokalisation der Leucin-Amino-peptidase-Reaktion. Aller-

dings ist umstritten, ob diese Substrate durch ein einheitliches Ferment hydrolysiert werden (NACHLAS et al. 1962b). In Modellversuchen wurde eine Spaltung der Substrate außer durch die Leucin-Aminopeptidase auch durch andere Fermente nachgewiesen (SYLVEN und BOIS 1962).

Die Spezifität des histochemischen Carboanhydrase-Nachweises ist ebenfalls zweifelhaft (FAND et al.; PEARSE). FAND et al. glauben, daß die Reaktion von KURATA nicht durch die Aktivität der Carboanhydrase hervorgerufen wird, sondern auf hohe Konzentrationen divalenter Kationen im Gewebe zurückzuführen ist. HÄUSLER beobachtete jedoch an mit den spezifischen Carboanhydrase-Inhibitor DIAMOX inkubierten Präparaten eine vollständige Hemmung der Reaktion. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen wurde durch DIAMOX eine deutliche Minderung des schwarzen Niederschlags hervorgerufen. Außerdem wird die histochemische Lokalisation des Fermentes in den Belegzellen der Magenschleimhaut, in den proximalen Nierentubuli und in den Erythrocyten (KURATA; HÄUSLER) durch biochemische Untersuchungen bestätigt (DAVENPORT).

Diese Befunde stehen im Widerspruch zu der Ansicht von FAND et al. Diese Untersuchungen am menschlichen Ovarium ergaben eine Lokalisation des Reaktionsproduktes in fermentreichen Strukturen, die auf Enzymaktivität hinweist. Daneben ist eine unspezifische Fällung nicht auszuschließen, da die mit DIAMOX inkubierten Präparate noch einen geringen Niederschlag aufwiesen. Die von HÄUSLER angegebene Methode zum Carboanhydrase-Nachweis führte im menschlichen Ovarium zu keiner Reaktion. Das negative Ergebnis ist ungeklärt.

V. Korrelation von Glykosidasen, Leucin-Aminopeptidase
und Carboanhydrase zu den Sexualhormonen

=====

Nach den Befunden verschiedener Autoren wird das Follikelhormon in den Thecazellen reifer und atretischer Follikel, in den Thecaorganen und in den Gelbkörpern produziert (ROCKENSCHAUB 1951; FETZER et al 1955). Doppeltbrechende Substanzen mit Sterolstruktur konnten in den Thecazellen nachgewiesen werden. Da der Gehalt dieser Substanzen vom Zyklus abhängige Schwankungen zeigt, wird angenommen, daß es sich um Vorstufen von Steroidhormonen handelt (Mc KAY et al. 1947; CLAEISSON et al. 1947).

STIEVE (1949) hält das Follikel-epithel, die Granulosa für den Bildungsort der Oestrogene. Im Liquor folliculi und in der Granulosa wurde Follikelhormon gefunden (MÜHLBOCK 1940). Allerdings ist der Hormonnachweis in bestimmten Strukturen nicht beweisend für die Bildung an dieser Stelle, da Synthese und Speicherung eines Stoffes in verschiedenen Zellen stattfinden kann. Die Follikelatresie ist mit einer Ausscheidung von Follikelhormon verbunden, das in den intakten Follikeln gespeichert war (ARON et al. 1953).

Das Gelbkörperhormon oder Progesteron wird in den Granulosaluteinzellen des Corpus luteum gebildet (FALCK 1959). KAUFMANN (1953) vermutet, daß die Produktion schon in der Granulosa sprungreifer Follikel stattfindet. Im Liquor von Tertiärfollikeln und im Corpus luteum wurde das Gelbkörperhormon nachgewiesen (ZANDER 1954).

Oestrogene bewirken im Uterus eine Ablagerung von Glykogen im Endometrium und eine Hyperämie des Myo- und Endometrium. Sie erhöhen die Permeabilität der Kapillarwände, die zu einem Einstrom von Wasser und Elektrolyten in das Gewebe führt. Das Hormon steigert den Energiestoffwechsel und den Eiweißaufbau. Außerdem wird eine direkte Aktivierung von Fermenten durch Oestrogene diskutiert (ROBERTS und SZEGO 1953).

Die Bedeutung der β -Glucuronidase im Oestrogenstoffwechsel ist umstritten. FISHMAN (1947, 1950, 1955) nimmt an, daß die β -Glucuronidase für die Wirkung des Follikelhormons wichtig ist. Die Bindung des Oestrogen an die Glucuronsäure, die der Autor als "metabolic conjugation" deutet, ist entscheidend für die Wirkung des Hormons an den Geschlechtsorganen. Nach LEVY et al. (1961) soll die β -Glucuronidase das Steroidhormon aus einer inaktiven Verbindung mit der Glucuronsäure befreien.

Die Gabe oestrogener Substanzen führt zu einem Anstieg der β -Glucuronidase-Aktivität in Uterus und Vagina der Maus, dagegen nicht in Leber, Milz und Niere (FISHMAN 1947). Nach Ovariectomie sinkt der Enzymspiegel im Uterus deutlich ab, in der Leber bleibt das Niveau konstant (FISHMAN et al. 1944; HARRIS et al. 1951). Durch Oestrogengaben wird der β -Glucuronidase-Spiegel im Uterus normalisiert (FISHMAN et al. 1953; KNOBIL 1952). An kastrierten Ratten bewirken Oestrogene und Progesteron einen Anstieg der Fermentaktivität der Brustdrüse, während die Enzymkonzentration der Leber unbeeinflusst ist (HOPKINS und COLE 1962; KNOBIL 1952).

Im Vaginalsekret von Frauen wird eine Abhängigkeit der β -Glucuronidase-Aktivität von der Follikelhormonproduktion beobachtet. Die Enzymkonzentration steigt bis einige Tage vor der Ovulation an, sinkt zur Zeit des Follikelsprungs ab und steigt bis zur Menstruation wieder an (FISHMAN et al. 1951). Auch im Endometrium sind im Verlauf des Zyklus Schwankungen der β -Glucuronidase-Aktivität zu erkennen. Der Fermentspiegel steigt in den ersten zwei Dritteln des Zyklus an und fällt dann bis zur Menstruation wieder ab (ODELL et al. 1950). In der Placenta geht die Hormonproduktion mit hoher β -Glucuronidase-Aktivität einher (BAUDON 1960). In der Schwangerschaft wird ein deutlicher Anstieg der Serumglucuronidase beobachtet (PASETTO et al. 1956). Post partum sinkt die Fermentkonzentration entsprechend dem Hormonspiegel rasch ab.

Im Corpus luteum menstruationis und graviditatis wurde biochemisch (LEVY et al. 1961) hohe β -Glucuronidase-Aktivität nachgewiesen. In den vorliegenden Untersuchungen wurde histochemisch im menschlichen Ovarium ebenfalls eine intensive β -Glucuronidase-Reaktion des Luteingewebes beobachtet. Auch in den anderen hormonaktiven Strukturen wurde eine hohe Enzymaktivität gefunden. Die Thecazellen der Tertiärfollikel und eines gesprungenen Follikels zeigten eine deutliche Fermentreaktion. Hohe Enzymaktivität wurde in den Corpora atretica thecalia und in der Theca atretischer Graaf'scher Follikel gefunden. (s. Tabelle Nr. III, S. 73). Die hohe β -Glucuronidase-Aktivität, die im menschlichen Ovarium nur in den hormonbildenden Zellen gefunden wurde, kann auf eine Beziehung des Fermentes zum Hormonstoffwechsel hinweisen. Jedoch kann allein durch die histochemische Lokalisation des Fermentes die Funktion nicht geklärt werden.

LEVY et al. (1961) fanden im Corpus luteum neben β -Glucuronidase, α - und β -Fucosidase und α -Mannosidase auch hohe β -Galactosidase-Aktivität. Durch den histochemischen Nachweis wurde das Ferment in den Luteinzellen lokalisiert. Außerdem ergaben diese Untersuchungen eine intensive β -Galactosidase-Reaktion in den Thecaorganen. Einige atretische, reife und ein gesprungener Follikel zeigten deutlich Fermentaktivität in den Thecazellen. Im übrigen Ovarialgewebe war β -Galactosidase-Aktivität nicht zu erfassen.

β -Galactosidase konnte wie β -Glucuronidase nur in den hormonbildenden Zellen des Eierstocks nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis kann ebenfalls auf eine Beziehung zwischen Hormonstoffwechsel und β -Galactosidase hindeuten.

Ein direkter Einfluß der Sexualhormone auf die Leucin-Amino-peptidase wird in der Literatur nicht beschrieben. Im Uterus kastrierter Ratten wird durch Oestrogen- und Progesterongaben ein Anstieg der Fermentaktivität im Myo- und Endometrium hervorgerufen (FUHRMANN 1960). Dabei geht der Anstieg der Leucin-Amino-peptidase dem Anstieg des

Organgewichtes parallel. Die Enzymaktivität scheint vom Zellwachstum abhängig zu sein, sie ist Anzeichen für die Höhe des Eiweißumsatzes. LOBEL et al. (1961) fanden im Ovarium der Ratte starke Leucin-Amino-peptidase-Aktivität in der Granulosa atretischer Follikel. Die Autoren erklären den hohen Fermentgehalt durch Rückbildungsvorgänge an den Follikeln.

Vorliegende Untersuchungen ergaben in zwei Corpora lutea von länger abgestorbenen Tubargraviditäten eine deutliche Leucin-Amino-peptidase-Reaktion im Lutein- und Bindegewebe, während in Gelbkörpern des 1. Trimenon von kurzfristig abgestorbenen Graviditäten keine oder nur eine schwache Enzymreaktion nachweisbar war. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Rückbildung der Gelbkörper und der Leucin-Amino-peptidase-Aktivität. Auch in älteren Corpora lutea menstruationis wurde eine schwache Fermentaktivität des ganzen Luteingewebes gefunden, während in jungen Gelbkörpern nur die Thecaluteinzellen reagierten.

Eine intensive Leucin-Amino-peptidase-Reaktion zeigten die Thecazellen reifer und atretischer Follikel, die Corpora atretica thecalia und die Thecaluteinzellen des Corpus luteum menstruationis. Dagegen reagierten Mark- und Rindengewebe, Primär- und Sekundärfollikel nicht.

(s. Tabelle Nr. III, S. 73).

Diese Befunde zeigen, daß hohe Leucin-Amino-peptidase-Aktivität nur in den Zellen des Ovarium vorhanden ist, in denen Steroidhormone gebildet werden. Es ist möglich, daß eine Beziehung des Fermentes zur Oestrogensynthese besteht. Dabei ist ungeklärt, ob die Leucin-Amino-peptidase direkt am Aufbau des Hormons beteiligt ist oder ob die Enzymaktivität mit dem gesteigerten Stoffwechsel dieser Zellen in Zusammenhang steht.

Verschiedene Autoren untersuchten den Einfluß der Sexualhormone auf die Carboanhydrase des Uterus. LUTWAK-MANN et al. (1957) fanden hohe Carboanhydrase-Aktivität im Endometrium des Kaninchenuterus. Die Fermentkonzentration ist von der Progesteronbildung im Corpus luteum

abhängig. Durch Hormongaben wird die Carboanhydrase-Aktivität gesteigert. Weitere Untersuchungen ergeben eine lineare Beziehung zwischen Progesterondosis und der Aktivität des Fermentes. Dabei geht der Gewichtsanstieg des Endometrium dem Fermentanstieg voraus (OGAWA et al. 1961).

Die Carboanhydrase des Endometrium der Ratte wird durch Progesteron nicht beeinflusst (BIALY et al. 1962). An kastrierten Tieren wird keine Minderung der Carboanhydrase-Konzentration des Uterus beobachtet (MIYAKE und PINCUS 1959). Dagegen sinkt der Enzymspiegel nach Oestradiolgaben entsprechend der Dosis. Der Abfall kann durch Progesteron aufgehalten werden (BIALY et al. 1962). Demgegenüber steigt nach Oestradiol-Applikation die Carboanhydrase-Konzentration in der Prostata an, nach Progesteron wird ein Abfall beobachtet.

Am Mäuseuterus wird durch Oestrogenzufuhr ein Anstieg der Fermentaktivität hervorgerufen (OGAWA et al. 1960). Progesterongaben führten nach dem Bericht von OGAWA et al. (1962) zu einem Abfall der Enzymkonzentration, während MADJEREK et al. (1961) keine Änderung beobachteten.

Die unterschiedlichen Befunde der Sexualhormonwirkung auf die Carboanhydrase des Uterus von Kaninchen, Ratte und Maus sind ungeklärt. Es ist bisher unbekannt, ob eine direkte Wirkung der Hormone auf die Carboanhydrase besteht. Der Enzymanstieg im Kaninchenendometrium durch Progesterongaben ist mit einem entsprechenden Gewichtsanstieg des Endometrium verbunden. Die erhöhte Carboanhydrase-Aktivität scheint durch die hormonbedingten Wachstumsprozesse hervorgerufen zu sein. Dagegen ist der starke Abfall der Enzymkonzentration im Rattenendometrium nach Oestradiolgaben nicht mit einer Gewichtsabnahme verbunden (BIALY et al. 1962).

Vorliegende Untersuchungen ergaben beim histochemischen Nachweis der Carboanhydrase im menschlichen Ovarium hohe Carboanhydrase-Aktivität in hormonbildenden Zellen, in der Granulosa und Theca reifer und atretischer Follikel und im Corpus luteum (s. Tabelle Nr. III, S. 73). Die

Lokalisation des Fermentes in diesen Strukturen deutet vielleicht auf eine Beteiligung der Carboanhydrase an der Hormonbildung hin. Andererseits war eine deutliche Enzymreaktion im Oberflächenepithel, an den Gefäßen und in atretischen Primär- und Sekundärfollikeln zu erkennen. Die Carboanhydrase-Aktivität könnte ein Zeichen des gesteigerten Stoffwechsels dieser Zellen sein. Eine eindeutige Korrelation der Carboanhydrase zu den Sexualhormonen ist durch diese Befunde nicht festzustellen.

Zusammenfassung:

Mit verschiedenen histochemischen Techniken wurden in 38 Ovarien, 9 Corpora lutea menstruationis und 15 Corpora lutea graviditatis von gesunden Frauen die Enzyme β -Glucuronidase, β -Galactosidase, Leucin-Amino-peptidase und Carboanhydrase nachgewiesen.

Zur Lokalisation der β -Glucuronidase wurden die von BURTON und PEARSE, von SELIGMAN et al. und von FISHMAN und BAKER angegebenen Methoden verwandt. Die β -Galactosidase-Reaktion wurde nach den Angaben von RUTENBURG et al. durchgeführt. Die Reaktionen von NACHLAS et al. wurden zum Leucin-Amino-peptidase-Nachweis benutzt. Die Carboanhydrase wurde nach der von GOEBEL und PUCHTLER modifizierten KURATA'schen Technik untersucht.

Hohe Glykosidasen- und Leucin-Amino-peptidase-Aktivität zeigten die reifen und atretischen Tertiärfollikel nur in der Thecazellschicht. Carboanhydrase-Aktivität war in den Theca- und Granulosazellen dieser Follikel zu erkennen. Außerdem war die Carboanhydrase an den Gefäßwänden lokalisiert. Hohe Aktivität aller untersuchten Fermente wurde in der Corpora thecalia gefunden.

Die Corpora lutea menstruationis ließen in den Granulosa- und Thecaluteinzellen hohe Glykosidasen- und Carboanhydrase-Aktivität erkennen. Leucin-Amino-peptidase war nur in den Thecaluteinzellen der Gelbkörper nachweisbar.

Die Corpora lutea graviditatis des 1. Trimenon zeigten starke Glykosidasen-Aktivität in Granulosa- und Thecaluteinzellen, während nur eine schwache Leucin-Amino-peptidase-Reaktion in den Thecaluteinzellen beobachtet wurde. In den Luteinzellen war auch eine deutliche Carboanhydrase-Aktivität zu erkennen. Am Ende der Gravidität fielen die Fermentreaktionen im Lutein-gewebe schwächer aus.

Die in der Literatur beschriebene Lokalisation der β -Glucuronidase im Rattenovarium stimmt mit den im menschlichen Ovarium gefundenen Ergebnissen nicht völlig überein. β -Glucuronidase-Aktivität wurde bei der Ratte und beim Menschen im Corpus luteum und in den Thecazellen reifer Follikel gefunden, während die Primärfollikel nur im Rattenovarium reagierten. Die Angaben der Literatur über die Lokalisation der Leucin-Amino-peptidase im menschlichen Ovarium entsprechen weitgehend den Befunden dieser Untersuchungen. Dagegen wurden deutlich Unterschiede zu den Ergebnissen im Meerschweinchen- und Rattenovarium festgestellt.

Die histochemische Lokalisation der β -Glucuronidase, der β -Galactosidase und der Leucin-Amino-peptidase ergab, daß diese Fermente nur in hormonaktiven Strukturen und in wachsenden, proliferierenden Zellen des menschlichen Ovarium erfaßbar waren. Das Stroma zeigte keine Fermentaktivität. Dieser Befund deutet vielleicht auf eine Beziehung dieser Enzyme zum Hormonstoffwechsel hin. Die Carboanhydrase war ebenfalls in hormonbildenden Zellen nachweisbar, wurde aber auch in den Gefäßwänden und in den Erythrocyten lokalisiert, weshalb ein Zusammenhang zwischen der Carboanhydrase-Aktivität und der Stoffwechselleistung der Zellen zu vermuten ist.

<u>Tabelle Nr. III</u>	<u>β-Glucuro- nidase</u>	<u>β-Galacto- sidase</u>	<u>Leucin-Ami- nopeptidase</u>	<u>Carboan- hydrase</u>
Oberflächenepithel	-/+ *	-	-	+
Tunica albuginea	-	-	-	-
Hinde	(+)/-	-	-	-
Mark	(+)	-	-	-
Gefäße	-	-	-/(+)	+
Primär foll., Epithel	-	-	-	-
Eizelle	Pl.-/+	Kern -/(+)	-	-
Sekundärf., Epithel	-	-	-	-/+
Eizelle	-	-	-	-
Tertiärfollikel				
Theca	+/(+)	-/(+)	-/+	-
Granulosa	-	-	-	+
Liquor	-	-	-	-
Graaf'scher Foll-	(gespr.)	(gespr.)		
Theca	+	(+)	+ /++	+
Granulosa	-	-	-/(+)	++
Liquor	(+)	-	-	(+)?
atret. Primärfoll.				
Epithel	-	-	-	+
Eizelle	Pl.-/+	Kern -/(+)	-	+/-
atret. Sekundärf.				
Epithel	-	-	-	+/-
Eizelle	-	-	-	-
atret. Tertiärfoll.				
Theca	(+)/-	-	-/(+)	(+)/++
Granulosa	-	-	-	++
Liquor	-	-	-	(+)
atret. Graaf'scher F.				
Theca	+ /++	-/+	++/-	(+)/++
Granulosa	(+)/-	-	-/(+)	++
Liquor	- /++ *	-	-	(+)
Corpus atret. thecale	++	++	++	+
Corpus lut. menstr.				
Thecaluteinzellen	++	++	++	++
Granulosa-" "	++	++	-	++
Bindegewebe	(+)	-	-	(+)
Gefäße	-	-	-	++
Corpus albicans				
untergeh. Luteingew.	-	-	-	-
Bindegewebe	-	-	-	-
Gefäße	-	-	-	+
Makrophagen	-	+	-	+
Corpus lut. grav. (1. Tri.)				
Thecaluteinzellen	++	++	(+)/-	+
Granulosa-" "	++	++	-	+
Bindegewebe	(+)	-	-	-
Corpus lut. grav. (von Sect.)				
Luteinzellen	+	+	(+)	(+)
Bindegewebe	-/(+)	-	(+)	-
Gefäße	-	-	-	+

* = nach der Reaktion von FISHMAN und BAKER

? = wird durch DIAMOX nicht gemindert

Pl. = Plasma

Tabelle Nr.IVHistochemische Methoden zur Fermentlokalisation

<u>Ferment</u>	<u>Autor</u>	<u>Fixierung</u>	<u>Substrat</u>	<u>Visualisation</u>	<u>Inkubation</u>
β -Glucuronidase	FISHMAN, BAKER (1956)	-i 10% Formalin	8-Hydroxychino- lin-Glucuronid	Kaliumferrocyanid H Cl	24 Std.bei 90 Min. " 8°C. 37°C.
"	SELIGMAN et al. (1954)	-i 10% Formalin	6-Brom-2-Naphthyl- β -Glucopyruronosid	Echtblausalz B	6 Std.bei 37°C.
"	BURTON, PEARSE (1952)	-	8-Hydroxychino- lin-Glucuronid	Echtblausalz RR	4 Std.bei 37°C.
β -Galactosidase	RUTENBURG et al. (1958)	-i 10% Formalin	6-Brom-2-Naphthyl- β -Galactopyranosid	Echtblausalz B	8 Std.bei 20°C.
Leucin- Aminopeptidase	NACHLAS et al. (1957)	-	L-Leucyl- β - Naphthylamid	Echtblausalz B	1 Std.bei 37°C.
"	NACHLAS et al. (1960)	-	L-Leucyl-4-Methoxy- β -Naphthylamid	-	1.Std.bei 37°C.
Carboanhydrase	(KURATA); GOEBEL, FUCHTER (1954)	abs. Azeton	NaHCO_3 + $\text{CoCl}_2/\text{CoSO}_4$	Ammoniumsulfid	1 Std.bei 37°C.
"	HÄUSLER (1958)	abs. Azeton	NaHCO_3 + CoSO_4	Ammoniumsulfid	2 Std.bei 20°C.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- ACKERMANN, G.A. Histochemical Demonstration of Amino-peptidase Activity in the Leucocytes of Blood and Bone Marrow. J.Histochem.Cytochem. 8, 386 (1960).
- ALVAREZ, A.; SAS , J. β -Galactosidase Changes in the Developing Intestinal Tract of the Rat. Nature 190, 826 (1961)
- AMMON, R. und DIRSCHERL, W. Fermente, Hormone, Vitamine und die Beziehung dieser Wirkstoffe zueinander. I Fermente. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1959)
- ARON, M. et ARON, C. L'atrésie folliculaire: déterminisme et signification. Arch. d'Anat. 36, 69 (1953)
- ARVY, L. Contribution à l'histoenzymologie de l'ovaire. Z.Zellforsch. 51, 406 (1960)
- ASHBY, W. Carboanhydrase in Mammalian Tissue. J.Biol.Chem. 151, 521 (1943)
- BAUDON, J.; BASTIDE, P. Activité β -glucuronidasique dans le placenta humain, le sang de la mère et celui du nouveau-né. Path. et Biol. 8, 487 (1960)
- BAUMANN, H. Untersuchungen über die intrazelluläre Verteilung der Karbonsäureanhydrase in der Rattenniere. Acta Biol.Med.Germ. 6, 229 (1961)
- BENZER, S. Induced Synthesis of Enzymes in Bacteria, Analyzed at the Cellular Level. Biochim.Biophys.Acta 11, 383 (1953)
- BERGER, J. and JOHNSON, M.J. The Occurence of Leucylpeptidase. J.Biol.Chem. 133, 157,(1940)
- BERLINER, R.W.; KENNEDY, T.J. and ORLOFF, J. Relationship between Acidification of the Urine and Potassium Metabolism. Effect of Carbonic Anhydrase Inhibition on Potassium Excretion. Amer.J.Med. 11, 274 (1951)
- BERLINER, R.W. and ORLOFF, J. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Pharmacol.Rev. 8, 137 (1956)

- BERNFELD, P. and
FISHMAN, W.H. A Coenzym of Spleen β -Glucuronidase.
Science 112, 653 (1950)
- BIALY, G. and
PINCUS, G. Effects of Estrogens and Progestin
on the Uterine Carbonic Anhydrase of
Immature Rats.
Endocrinology 70, 781 (1962)
- BILLETT, F. and
McGEERUSSELL, S.M. The Histochemical Localisation of
 β -Glucuronidase in the Digestive Gland
of Roman Snail (*Helix pomatia*).
Quart.J.Micr.Sci. 96, 35 (1955)
- The Histochemical Localisation of
 β -Glucuronidase in the Liver of the
Newt.
Quart.J.Micr.Sci. 97, 155 (1956)
- BILLETT, F. β -Glucuronidase Activity during the
Early Development of *Xenopus laevis*
Embryos. Biochem.J. 67, 463 (1957)
- BIRNBAUM, D. and
HOLANDER, F. Inhibition of Pancreatic Secretion
by the Carbonic Anhydrase Inhibitor
2-Acetylamino-1, 3, 4-Thiadiazole-5-
Sulfonamid, Diamox (6063)
Amer.J.Physiol. 174, 191 (1953)
- BOOTH, V.H. A Carbonic Anhydrase Inhibitor in
Serum. J.Physiol. 87, 41P (1936)
J.Physiol. 91, 474 (1938)
- BOURQUELOT, E. J.Pharm.Chim. 10, 361 (1914)
zit. VEIBEL, S.
- BOYLAND, E.;
WALLACE, D.M. and
WILLIAMS, D.C. The Activity of the Enzymes Sulphatase
and Glucuronidase in the Urine of
Normal and Cancer Patients.
Biochem.J. 56, XXIX (1954)
- BRAUN-FALCO, O. und
RATHJENS, B. Über die histochemische Darstellung
der Kohlensäureanhydratase in nor-
maler Haut.
Arch.klin.exp.Dermatol. 201, 73 (1955a)
Über Vorkommen von Kohlensäureanhydra-
tase in menschlicher Haut.
Experientia 11, 229 (1955b)
- Zur Frage spezifischer Hemmung der Nie-
ren-Kohlensäureanhydratase im histolo-
gischen Schnitt durch 2-Acetylamino-1,
3, 4-Thiadiazol-5-Sulfonamid.
Acta Histochem. 2, 39 (1956a)

- BRAUN-FALCO, O. Zur Histotopographie der β -Glucuronidase in normaler menschlicher Haut. Arch.klin.exp.Dermatol. 203, 61 (1956b)
- Histochemical Demonstration of Amino-peptidase in Normal and Pathological Skin. J.Histochem.Cytochem. 5, 94 (1957)
- BRAUN-FALCO, O. und SALFELD, K. Leucine Amino-peptidase Activity in Mast Cells. Nature 183, 51 (1959)
- BRINKMAN, R. and MARGARIA, R. The Influence of Haemoglobin on the Hydration and Dehydration Velocity of CO_2 . J.Physiol. 75, 3P (1932)
- BURSTONE, M.S. and FOLK, J.E. Histochemical Demonstration of Amino-peptidase. J.Histochem.Cytochem. 4, 217 (1956)
- BURSTONE, M.S. and WEISBURGER, E.K. Histochemical Demonstration of Amino-peptidase by a New Oxidation Technique. J.Histochem.Cytochem. 9, 712 (1961)
- BURTON, J.F. and PEARSE, A.G.E. A Critical Study of the Methods for Histochemical Localisation of β -Glucuronidase. Brit.J.Exp.Path. 33, 87 (1952)
- CAMPBELL, J.G. The Intracellular Localisation of β -Glucuronidase. Brit.J.Exp.Path. 30 548 (1949)
- CARMICHAEL, P.L.; HAMBLIN, C.; GREEN, H. and LEOPOLD, J.H. Evaluation of Histochemical Techniques for Carbonic Anhydrase in Ocular Tissues. A.M.A.Arch.Ophth. 58, 169 (1958)
- CHAUNCEY, H.H. and QUINTARELLI, G. Localisation of Acid Phosphatase, Non Specific Esterases, and β -D-Galactosidase in Parotid and Submaxillary Gland of Domestic and Laboratory Animals. Amer.J.Anat. 108, 263 (1961)
- CLAESSON, L. and HILLARP, N.A. The Formation Mechanism of Estrogenic Hormones. Acta physiol.scand. 14, 115 (1947)
- COHEN, R.B. TSOU, K.-C.; RUTHENBURG, S.H. and SELIGMAN, A.M. The Colorimetric Estimation and Histochemical Demonstration of β -D-Galactosidase. J.Biol.Chem. 195, 239 (1952)

- CONCHIE, J. *β -Galactosidase in Mamalian Tissues and its Response to Sex Hormones. J.Physiol. 139, 20P (1957)*
- CONCHIE, J. and LEVVY, G.A. *Inhibition of Glycosidases by Aldactones of Corresponding Configuration. Biochem.J. 65, 389 (1957)*
- CONCHIE, J. and FINDLAY, J. *Influence of Gonadectomy, Sex Hormones and other Factors on the Activity of Certain Glycosidases in the Rat and Mouse. J.Endocrin. 18, 132 (1959a)*
- CONCHIE, J.; FINDLAY, J. and LEVVY, G.A. *Mammalian Glycosidases. Distribution in the Body. Biochem.J. 71, 318 (1959b)*
- DAHLQUIST, A. *Pig.Intestinal β -Glucosidase Activities. I. Relation to β -Galactosidase (Lactase). Biochem.Biophys.Acta 50, 55 (1961a)*
The Location of Carbohydrases in the Digestive Tract of the Pig. Biochem.J.78, 282 (1961b)
- DAVENPORT, H.W. and FISHER, R.B. *Carbonic Anhydrase in the Gastro-Intestinal Mucosa. J.Physiol. 94, 16P (1938)*
- DAVENPORT, H.W. and WILHELM, A.E. *Renal Carbonic Anhydrase. Proc.Soc.exp.Biol. 48, 53 (1941)*
- DAVENPORT, H.W. *Proc.Soc.exp.Biol. 49, 87 (1941)*
zit. nach RICHTERICH, R.
- DAVIES, R.E. and ROUGHTON, F.J.W. *Acid Production by Isolated Mucosa (Appendix). Biochem.J. 42, 618 (1948)*
- DAVIES, R.E. and EDELMAN, J. *The Function of Carbonic Anhydrase in the Stomach. Biochem.J. 50, 190 (1952)*
- DIXON, M. and WEBB, E.C. *Enzymes. Longmans, Green and Co Ltd. London (1958)*
- De DUVE, C.; PRESSMAN, B.C.; GIANETTO, R.; WATTIAUX, R. and APPELMANS, F. *Tissue Fractionation Studies. 6. Intracellular Distribution Patterns of Enzymes in Rat Liver Tissue. Biochem.J. 60, 604 (1955)*
- FALCK, B. *Site of Production of Estrogen in Rat Ovary as studied in Micro-Transplants. Acta physiol.scand.47 Suppl.163,1 (1959)*

- FAND, S.B.;
LEVINE, H.J. and
ERWIN, H.L. A Reappraisal of the Histochemical
Method for Carbonic Anhydrase.
J.Histochem.Cytochem. 7, 27 (1959)
- FERNLEY, H.W. Effects of Some Heavy-Metal Ions on
Purified Mammalian β -Glucuronidase.
Biochem.J. 82, 500 (1962)
- FETZER, S.;
HILLEBRECHT, J. und
MUSCHKE, H.E. Zur Morphokinese der interstitiellen
Zellen des Ovariums der Ratte.
Naturwiss. 42, 302 (1955).
- FISCHER, R. Über den histochemischen Nachweis
der Aminopeptidase im Krebsgewebe.
Z.Krebsforsch. 63, 18 (1959)
- FISHMAN, J.S. and
HAYASHI, M. Enzymorphology of Rat Brain; β -Glu-
curonidase, Alkaline Phosphatase,
Esterase.
J.Histochem.Cytochem. 10, 515 (1962)
- FISHMAN, W.H. Studies on β -Glucuronidase. III. The
Increase in β -Glucuronidase Activity
of Mammalian Tissues Induced by Fee-
ding Glucuronidogenic Substances.
J.Biol.Chem. 136, 229 (1940)
- FISHMAN, W.H. and
FISHMAN, L.W. The Elevation of Uterine β -Glucuroni-
dase Activity by Estrognic Hormones.
J.Biol.Chem. 152, 487 (1944)
- FISHMAN, W.H. β -Glucuronidase: Its Relation to the
Action of Estrognic Hormones.
J.Biol.Chem. 169, 7 (1947a)

 β -Glucuronidase Activity of the Blood
and Tissues of Obstetrical and Surgi-
cal Patients.
Science 105, 646 (1947b)
- FISHMAN, W.H. and
ANLYAN, A.J. Comparision of the β -Glucuronidase
Activity of Normal, Tumor, and Lymph
Node Tissues of Surgical Patients.
Science 106, 66 (1947c)
- FISHMAN, W.H.;
ANLYAN, A.J. and
GORDON, E. β -Glucuronidase Activity in Human
Tissues; some Correlations with Pro-
cesses of Malignant Growth and with
the Physiology of Reproduction.
Cancer Res. 7. 808 (1947d)
- FISHMAN, W.H. β -Glucuronidase.
The Enzymes I, 1, 635 (1950)
- FISHMAN, W.H.;
KASDON, S.C. and
HOMBURGER, F. β -Glucuronidase Studies in Women. I.
Observation in 500 Non-pregnant, Non-
cancerous Subjects.
J.Amer.Med.Assoc. 143, 350 (1950)

- FISHMAN, W.H.;
KASDON, S.C.;
BONNER, C.D.;
FISHMAN, L.W. and
HOMBURGER, F.
B-Glucuronidase Studies in Women. V. The Menstrual Cycle, and Serum B-Glucuronidase Activity in Estrogen-Treated Postmenopausal Subjects. J.clin.Endocrin. 11, 1425 (1951)
- FISHMAN, W.H. and
FARMELANT, M.H.
Effects of Androgen and Estrogen on B-Glucuronidase in Inbred Mice. Endocrinology 52, 536 (1953)
- FISHMAN, W.H.
B-Glucuronidase. Advanc.Enzymol. 16, 361 (1955)
- FISHMAN, W.H. and
BAKER, J.R.
Cellular Localisation of B-Glucuronidase in Rat Tissues. J.Histochem.Cytochem. 4, 570 (1956a)
- FISHMAN, W.H. and
GREEN, S.
Glucosiduronic Acid Synthesis by B-Glucuronidase in a Transfer Reaction. J.Amer.Chem.Soc. 78, 880 (1956b)
- FOLK, J.E. and
BURSTONE, M.S.
Chromogenic Leucyl Substrates for Aminopeptidase and Papain Proc.Soc.exp.Biol. 89, 473 (1955)
- FRIEDENWALD, J.S. and
BECKER, B.
The Histochemical Localisation of Glucuronidase. J.Cell.Comp.Physiol. 31, 303 (1948)
- FRUTON, J.S. and
SIMMONDS, S.
General Biochemistry, 2nd Ed. J.Wiley & Sons, New York (1953)
zit. nach GLENNER, G.G.
- FUHRMANN, K.
Kolorimetrische Bestimmung und histochemischer Nachweis der Aminopeptidase an Geweben weiblicher Genitalorgane. Zbl.Gynäk. 81, 115 (1959)
Über die Wirkung der Sexualhormone auf die eiweißspaltenden Fermente der Uterusmuskulatur. Z.Geburtsh.Gynäk. 155, 12 (1960)
Histochemische Beobachtungen über die Leucin-Aminopeptidase-Aktivität bei Kollumkarzinom. Zbl.Gynäk. 83, 213 (1961)
- GALE, E.F and
FOLKES, J.P.
The Assimilation of Amino Acids by Bacteria. 21. The Effect of Nucleic Acids on the Development of Certain Enzymic Activities in Disrupted Staphylococcal Cells. Biochem.J. 59, 675 (1955)

- GLENNER, G.G.;
BURSTONE, M.S. and
MEYER, D.B. A Study of Amino-peptidase Activity
in Stroma of Neoplastic Tissue with
a Comparision of Histochemical Tech-
niques.
J.nat.Cancer Inst. 23, 857 (1959)
- GIBIAN, H. Chemie und Biologie der Kohlensäure-
anhydratase.
Angew.Chemie 66, 245 (1954)
- GOEBEL, A. und
PUCHTLER, H. Zur Darstellung der Carboanhydrase
im histologischen Schnitt.
Naturwiss. 41, 531 (1954)
- GOLDBARG, J.A. and
RUTENBURG, A.M. The Colorimetric Determination of
Leucine Amino-peptidase in Urine and
Serum of Normal Subjects and Patients
with Cancer and other Diseases.
Cancer 11, 283 (1958)
- GOLDFARB, A. and
BARKA, T. Cytologic Localization of β -Glucuro-
nidase.
J.Histochem.Cytochem. 8, 226 (1960)
- GOMORI, G. Enzymatic Hydrolysis of Acyl-Naphthyl-
amines.
Proc.Soc.exp.Biol. 85, 570 (1954a)
Chromogenic Substrates for Amino-pep-
tidase.
Proc.Soc.exp.Biol. 87, 559 (1954b)
- VAN GOOR, H. Die Verbreitung und Bedeutung der
Carboanhydrase.
Enzymologia 8, 113 (1940)
- GRAY, W.D.;
RAUH, C.E. and
SHANAHAN, R.W. The Intracellular Localization of
Carbonic Anhydrase and a Carbonic
Anhydrase Inhibitor in the Brains of
Mice.
Biochem.Pharm. 8, 307 (1961)
- GREEN, M.N.; TSOU, K-C.;
BRESSLER, R. and
SELIGMAN, A.M. Colorimetric Determination of Leuci-
ne-Amino-peptidase Activity with L-Leu-
cyl- β -Naphthylamide Hydrochlorid.
Arch.Biochem.Biophys. 57, 458 (1955)
- GUBISCH, W. und
SCHLAGER, F. Fermente im Knochen- und Knorpelge-
webe III.Mitteilung, β -D-Glucuronidase.
Acta Histochem. 12, 69 (1961)

- HANNIBAL, M.J. and
NACHLAS, M.M. Further Studies on the Lyo- and
Desmocomponents of Several Hydro-
lytic Enzymes and their Histochemical
Significance.
J.biophys.biochem.Cyt. 5, 279 (1959)
- HARRIS, R.S. and The Influence of Ovarian Hormones on
the Enzymic Activities of Tissues.
Endocrinology 48, 264 (1951)
- HATZMICHAEL, A. Comparision of Vaginal and Cervical
B-Glucuronidase in Relation to Can-
cer of the Cervix and Uterus.
Amer.J.Obstet.Gynec. 84, 94 (1962)
- HÄUSLER, G. Zur Technik und Spezifität des hi-
stochemischen Carboanhydrasenachwei-
ses in Modellversuchen und in Gewebs-
schnitten von Rattennieren.
Histochemie 1, 29 (1958)
- HAYASHI, M.; SIMODA, K.;
OGATA, K.; TAKAMORI, T.;
SHIRAOGAWA, T. and
KAWASE, O. Histochemical Studies on the Uterine
B-Glucuronidase, Esterase, Sulfatase
Activity during the Rat Estrous Cycle.
Acta Histochem. 3, 277 (1956)
- HELFERICH, B. und
VORSATZ, F. Über Kaffee-Emulsin. Emulsin XXV.
Z.phyiol.Chem. 237, 254 (1935)
- HENRIQUES, O.M. Die Bindungsweise des Kohlendioxyds
im Blute.
Biochem.Zeitschr. 200, 1 (1928)
- HOFFMANN-OSTENHOF, O. Enzymologie.
Springer-Verlag, Wien (1954)
- HOFMANN, E. Über das Emulsin der Hagebutten
(rosa canina).
Biochem.Zeitschr. 267, 309 (1933)
- HOPKINS, T.R. and
COLE, R.D. A Comparision of the Effects of Hor-
mones upon B-Glucuronidase and Alka-
line Phosphatase Activities in Mam-
mary Gland and Liver.
Endocrinology 70, 606 (1962)
- HOVE, E.;
ELVEHJEM, C.A. and
HART, E.B. The Relation of Zinc to Carbonic
Anhydrase.
J.Biol.Chem. 136, 425 (1940)
- HUDSON, B.; SHEATH, J.
and DULMANIS, A. Hydrolysis of Steroid Glucuronides
with B-Glucuronidase from Preputial
Glands of Female Rat.
Endocrinology 70, 189 (1962)

- JANOWITZ, H.D.;
COLCHER, H.; and
HOLLANDER, F. Inhibition of Gastric Secretion of
Acid in Dogs by Carbonic Anhydrase
Inhibitor, 2-Acetylamino-1,3,4,-Thia-
diazole-5-Sulfonamide.
Amer.J.Physiol. 171, 325 (1952)
- JOHNSON, M.J.;
JOHNSON, G.H. and
PETERSON, W.H. The Magnesium-activated Leucyl-Pep-
tidase of Animal Erepsin.
J.Biol.Chem. 116, 515 (1936)
- JOHNSON, M.J. and
BERGER, J. The Enzymatic Properties of Peptidases.
Advanc.Enzymol. 2, 69 (1952)
- KARUNAIRATNAM, M.C. and
LEVY, G.A. The Inhibition of β -Glucuronidase by
Saccharic Acid and the Role of the
Enzyme in Glucuronide Synthesis.
Biochem.J. 44, 599 (1949)
- KAUFMANN, C. Corpus luteum.
Arch.Gynäk. 183, 264 (1953)
- KEILIN, D. and
MANN, T. Carbonic Anhydrase. Purification and
Nature of the Enzyme.
Biochem.J. 34, 1163 (1940)
Activity of Carbonic Anhydrase
within Red Blood Corpuscles.
Nature 148, 493 (1941)
- KERR, L.M.H.;
CAMBELL, J.G. and
LEVY, G.A. β -Glucuronidase as an Index of Growth
in the Uterus and other Organs.
Biochem.J. 44, 487 (1949)
- KNOBIL, E. The Relation of some Steroid Hormo-
nes to β -Glucuronidase Activity.
Endocrinology 50, 16 (1952)
- KREBS, H.A. Inhibition of Carbonic Anhydrase by
Sulphonamides.
Biochem.J. 43, 525 (1948)
- KUBY, S.A. and
LARDY, H.A. Purification and Kinetics of β -D-Ga-
lactosidase from Escherichia coli,
Strain K-12.
J.Amer.Chem.Soc. 75, 890 (1953)
- KURATA, Y. Histochemical Demonstration of Car-
bonic Anhydrase Activity.
Stain.Technol. 28, 231 (1953)
- LEHNARTZ, E. Einführung in die chemische Physiologie
Springer-Verlag, Berlin (1959)
- LEVY, G.A.; KERR, L.M.H. and
CAMBELL, J.G. β -Glucuronidase and Cell Proliferation.
Biochem.J. 42, 462 (1948)

- LEVY, G.A. The Preparations and Properties of β -Glucuronidase. 4..Inhibition by Sugar Acids and their Lactones. Biochem.J.52, 464 (1952)
- LEVY, G.A.; McALLAN, A. and MARSH, C.A. Purification of β -Glucuronidase from Preputial Gland of the Female Rat. Biochem.J. 69, 22 (1958)
- LEVY, G.A.; McALLAN, A. and HAY, A.J. Glycosidases in the Corpus Luteum. J.Endocrin. 23, 19 (1961)
- LINDERSTOM-LANG, K. Über Darmerepsin. Z.physiol.Chem. 182, 151 (1929)
- LINKER, A.; MEYER, K. and WEISSMANN, B. Enzymatic Formation of Monosaccharides from Hyaluronate. J.Biol.Chem. 213, 237 (1955)
- LIPP, W. Amino-peptidase in Bone Cells. J.Histochem.Cytochem. 7, 205 (1959)
- LOBEL, B.L.; ROSENBAUM, R.M. and DEANE, H.W. Enzymic Correlates of Physiological Regression of Follicles and Corpora Lutea in Ovaries of Normal Rats. Endocrinology 68, 232 (1961)
- LUTWAK-MANN, C. and ADAMS, C.E. Carbonic Anhydrase in the Female Reproductive Tract. Occurrence, Distribution and Hormonal Dependence. J.Endocrin. 13, 26 (1955)
- Endometrial Carbonic Anhydrase as Indicator of Luteoid Potency: Correlation with Progesterational Proliferation. J.Endocrin. 15, 43 (1957)
- MADJEREK, Z. and VAN DER VIES, J. Carbonic Anhydrase Activity in the Uteri of Mice under Experimental Conditions. Acta Endocrin. 38, 315 (1961)
- MAIO, J.J. and RICKENBERG, H.V. The β -Galactosidase of Mouse Strain L-Cells and Mouse Organs. Biochem.Biophys.Acta 37, 101 (1960)
- MANN, T. and KEILIN, D. Sulphonamide as a Specific Inhibitor of Carbonic Anhydrase. Nature 146, 164 (1940)
- MAREN, T.H.; MAYER, E. and WADSWORTH, B.C. Carbonic Anhydrase Inhibition. I. The Pharmacology of Diamox, 2-Acetylamin-1,3,4-Thiadiazole-5-Sulfonamide. John Hopkins Hosp.Bull. 95, 199 (1954)

- McKAY, D. and
ROBINSON, D. Observations on the Fluorescence,
Birefringence and Histochemistry of
the Human Ovary During the Menstrual
Cycle.
Endocrinology 41, 378 (1947)
- MELDRUM, N.U. and
ROUGHTON, F.J.W. Carbonic Anhydrase. Its Preparation
and Properties.
J.Physiol. 80, 113 (1933)
- MILLER, W.H.,
DESSERT, A.M. and
ROBLIN, R.O. Heterocyclic Sulfonamides as Car-
bonic Anhydrase Inhibitors.
J.Amer.Chem.Soc. 72, 4893 (1950)
- MILLS, G.T.;
PAUL, J. and
SMITH, E.E.B. Studies on β -Glucuronidase. 2. The
Preparation and Properties of three
Ox-Spleen β -Glucuronidase Fractions.
Biochem.J. 53, 232 (1953a)
- Studies on β -Glucuronidase. 3. The
Influence of Age, Partial Heparectomy,
and other Factors on the β -Glu-
curonidase Activity of Rat Liver.
Biochem.J. 53, 245 (1953b)
- MIYAKE, T. and
PINCUS, G. Hormonal Influences on the Carbonic
Anhydrase Concentration in the Acces-
sory Reproductive Tracts of the Rat.
Endocrinology 65, 64 (1959)
- MONIS, B. and
RUTENBURG, A.M. Histochemical Demonstration of β -D-
Glucuronidase in Malignant Tumors.
J.Histochem.Cytochem. 4, 498 (1956)
- MONIS, B.;
NACHLAS, M.M. and
SELIGMAN, A.M. Study of Leucine Amino-peptidase in
Neoplastic and Inflammatory Tissues
with a New Histochemical Method.
Cancer 12, 601 (1959)
- MONIS, B.;
BANKER, B.M. and
RUTENBURG, A.M. β -Glucuronidase Activity in Ma-
lignant Neoplasms of Man: a Histo-
chemical Study.
Cancer 13, 386 (1960)
- MONOD, J. et
COHN, M. La Biosynthèse Induite des Enzymes
(Adaptation Enzymatiques).
Advanc.Enzymol. 13, 67 (1952)
- MONTAGNA, W. Histology and Histochemistry of
Human Skin. XI. The Distribution of
 β -Glucuronidase.
J.biophys.biochem.Cyt. 3, 343 (1957)
- MÜHLBOCK, O. Freies und gebundenes Brunsthormon
im menschlichen Follikelsaft.
Acta brev.neerl.Physiol. 10, (1940)
- MUSTAKALLIO, K.K.;
RAEKALLIO, J. and
RAEKALLIO, E. The Histochemical Demonstration of
Carbonic Anhydrase, An Attempt to
localize its Inhibition by Acetazo-
lamide (Diamox^R) in Rat Kidney.
Ann.med.Exp.Biol.Fenniae 33, 247 (1960)

NACHLAS, M.M.;
CRAWFORD, D.T. and
SELIGMAN, A.M.

The Histochemical Demonstration of
Leucine Aminopeptidase.
J.Histochem.Cytochem. 5, 264, (1957)

NACHLAS, M.M.;
ROSENBLATT, D.H.;
MONIS, B. and
SELIGMAN, A.M.

Improvement in the Histochemical Lo-
calization of Leucine Aminopeptidase
with a New Substrate. L-Leucyl-4-
Methoxy-2-Naphthylamide.
J.biophys.biochem.Cyt. 7, 261 (1960)

NACHLAS, M.M.;
FRIEDMAN, M.M. and
SELIGMAN, A.M.

New Observations Revealing Current
Misconceptions in the Localization
of Leucine Aminopeptidase.
J.Histochem.Cytochem. 9, 608 (1961)

New Observations an Discrepancies in
the Histochemical Localization of
Leucine-Aminopeptidase.
J.Histochem.Cytochem. 10, 315 (1962a)

NACHLAS, M.M.;
GOLDSTEIN, T.P. and
SELIGMAN, A.M.

An Evaluation of Aminopeptidase
Specificity with seven Chromogenic
Substrates.
Arch.Biochem. 97, 223 (1962b)

NAYYAR, S.H. and
GLICK, D.

Effect of Alcohols on β -Glucuronidase
Activity.
J.Biol.Chem.222, 73 (1956)

NEUBERG, C. and
HOFMANN, E.

Über die Hydrolyse des Milchzuckers
durch Fermente aus Leber und Niere.
Biochem.Z. 281, 431 (1935)

NIEMI, M. and
IKONEN, M.

Histochemical Evidence of Amino pep-
tidase in Rat Pineal Gland.
Nature 185, 928 (1960)

NOVAK, E.

Gynecologic and Obstetric Pathology.
Philadelphia: W.B.Sannders Comp.
(1953) zit. nach WATZKA, M.

NOVIKOFF, A.B.;
SHIN, W-Y. and
DRUCKER, J.

Cold Acetone Fixation for Enzyme Lo-
calization in Frozen Sections.
J.Histochem.Cytochem. 8, 37 (1960)

ODELL, L.D. and
MCDONALD

Serum Beta-Glucuronidase Levels Dur-
ing Toxemia of Pregnancy.
Amer.J.Obstet.Gyn. 56, 74 (1948)

ODELL, L.D. and
FISHMAN, W.H.

Studies on β -Glucuronidase: I.Activi-
ties in Human Endometrium.
Amer.J.Obstet.Gyn. 59, 200 (1950)

OGAWA, Y. and
PINCUS, G.

Micro-Determination of Carbonic An-
hydrase Activity in Animal Tissue.
Endocrinology 67, 551 (1960)

- OGAWA, Y. and
PINCUS, G. Further Studies on Progesterin Bioassay using the Endometrial Response in the Rabbit. Endocrinology 68, 680 (1961)
Estrogen Effects on the Carbonic Anhydrase Content of Mouse Uteri. Endocrinology 70, 359 (1962)
- PASETTO, N. ed
ERMIGLIA, G. La beta-glucuronidasi ematica in gravidanza ed in puerperio. Quäd.Clin.ostetr. II, 123 (1956)
- PATTERSON, E.K.;
KEPPEL, A. and
HSIO, S.H. Evidence from Purification Procedures that the Enzyme which hydrolyses L-Leucyl- β -Naphthalamide is not the Classical Leucine Aminopeptidase. J.Histochem.Cytochem. 9, 609 (1961)
- PEARSE, A.G.E. and
TREMBLAY, G. Leucine Aminopeptidase in Rat Parathyroid and its Relation to Parathyroid Hormone Production. Nature 181, 1532 (1958)
- PEARSE, A.G.E. Histochemistry. Theoretical and Applied. 2.Auflage 1960. J.& A. Churchill Ltd. London.
- PETERMANN, M.L. and
HAKALA, N.V. Molecular Kinetic and Electrophoretic Studies on Carbonic Anhydrase. J.Biol.Chem. 147, 701 (1942)
- POPE, A. and
ANFINSEN, C.B. Histochemical Distribution of Peptidase Activity in the Central Nervous System of the Rat. J.Biol.Chem. 173, 305 (1948)
- PUCHTLER, hH. und
RANNIGER, K. Einfluß von Diamox auf die histochemisch nachweisbare Carboanhydrase. Naturwiss. 42, 297 (1955)
- PUGH, D. and
WALKER, P.G. Histochemical Localization of β -Glucuronidase and N-acetyl- β -Glucosaminidase. J.Histochem.Cytochem. 9, 105 (1961)
- REITHEL, J.F. and
KIM, J.C. Studies on the β -Galactosidase Isolated from Escherichia coli ML 308. I. The Effect of Some Ions on Enzymic Activity. Arch.Biochem.Biophys. 90, 271 (1960)
- RICHTERICH, R. Enzymopathologie. Enzyme in Klinik und Forschung. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1958)

- ROBERTS, S. and
SZEBO, C.M. Steroid Interaction in the Metabolism of Reproductive Target Organs. *Physiol.Rev.* 33, 593 (1953)
- ROBLIN, R.O.;
CLAPP, J.W. The Preparation of Heterocyclic Sulfonamides. *J.Amer.Chem.Soc.* 72, 4890 (1950)
- ROCKENSCHAUB, A. Die Eigenfluoreszenz in Follikeln und Gelbkörpern. *Zbl.Gynäk.* 14, 1206 (1951)
- ROSENBAUM, R.M.;
LOBEL, B. and
DEANE, H.W. Cyclic Changes in Hydrolytic Enzymic Activity in Follicles and Corpora Lutea of Rat Ovaries. *J.Histochem.Cytochem.* 8, 320 (1960)
- ROSENBLATT, D.H.;
NACHLAS, M.M. and
SELIGMAN, A.M. Synthesis of m-Methoxynaphthylamines as Precursors for Chromogenic Substrates. *J.Amer.Chem.Soc.* 80, 2463 (1958)
- ROUGHTON, F.J.W. and
BOOTH, V.H. The Manometric Determination of the Activity of Carbonic Anhydrase under Varied Conditions. *Biochem.J.* 40, 309 (1946)
- The Effect of Substrate Concentration, pH and other Factors upon the Activity of Carbonic Anhydrase. *Biochem.J.* 40, 319 (1946)
- ROUGHTON, F.J.W. and
CLARK, A.M. Carbonic Anhydrase. *The Enzymes* I, 1250 (1951)
- RUTENBURG, S.H. and
SELIGMAN, A.M. Colorimetric Estimation of β -Glucuronidase Activity with 8-Benzoylamino-2-Naphthyl- β -D-Glucuronid. *J.Biol.Chem.* 203, 731 (1953)
- RUTENBURG, A.M.;
RUTENBURG, S.H.; MONIS, B.;
TEAGUE, R. and
SELIGMAN, A.M. Histochemical Demonstration of β -D-Galactosidase in the Rat. *J.Histochem.Cytochem.* 6, 122 (1958)
- SAND, H.F. Source of the Bicarbonate of Saliva. *J.applied Physiol.* 4, 66 (1951)
- SCHLAGER, F. Vorkommen und Lokalisation von β -D-Galactosidase im Knochen, Knorpel und im angrenzenden Gewebe. *Acta Histochem.* 8, 176 (1959)
- SCOTT, D.A. and
MENDIVE, J.R. Chemical Observations on Carbonic Anhydrase. *J.Biol.Chem.* 140, 445 (1941)
- SCOTT, D.A. and
FISHER, A.M. Carbonic Anhydrase. *J.Biol.Chem.* 144, 371 (1942)

- SELIGMAN, A.M.;
NACHLAS, M.M.;
MANHEIMER, L.H.;
FRIEDMAN, O.M. and
WOLF, G. Development of New Methods for the
Histochemical Demonstration of Hy-
drolytic Intracellular Enzymes in
a Program of Cancer Research.
Ann.Surg. 130, 333 (1949)
- SELIGMAN, A.M.;
CHAUNCEY, H.H.;
NACHLAS, M.M. Effect of Formalin Fixation on the
Activity of five Enzymes of Rat Liver.
Stain.Technol. 26, 19, (1951)
- SELIGMAN, A.M.; TSOU, K-C.
RUTENBURG, S.H. and
COHEN, R.G. Histochemical Demonstration of β -D-
Glucuronidase.
J.Histochem.Cytochem. 2, 209 (1954)
- SELLINGER, O.L.;
BEAUFAY, H.;
JAQUES, P.;
DOYEN, A. and
DeDUVE, C. Tissue Fractionation Studies. 15. In-
tracellular Distribution and Proper-
ties of β -N-Acetylglucosaminidase and
 β -Galactosidase.
Biochem.J. 74, 450 (1960)
- SMITH, E.L. and
BERGMANN, M. The Peptidases of Intestinal Mucosa.
J.Biol.Chem. 153, 627 (1944)
- SMITH, E.L. The Peptidases of Skeletal, Heart
and Uterine Muscle.
J.Biol.Chem. 173, 553 (1947)
The Specificity of Certain Peptidases.
Advanc.Enzymol. 12, 191 (1951)
- SMITH, E.L. and
SPACKMAN, D.H. Leucine Aminopeptidase. V. Activation,
Specificity and Mechanism of Action.
J.Biol.Chem. 212, 271 (1955)
- SPACKMAN, D.H.;
SMITH, E.L. and
BROWN, D.M. Leucine Aminopeptidase. IV. Isolation
and Properties of the Enzyme from
Swine Kidney.
J.Biol.Chem. 212, 255 (1955)
- STIEVE, H. Anatomisch-nachweisbare Vorgänge
im Eierstock des Menschen und ihre
umweltbedingte Steuerung.
Geburtsh.Frauenh. 9, 639 (1949)
- STOLK, A. Histochemical Localization of β -Glu-
curonidase in Healing Wounds of the
Axelotl.
Nature 194, 692
- SUMNER, J.B. 1926, zit. nach Lehnartz, E S.282
- SYLVEN, B. and
MALMGREN, H. The Histological Distribution of
Proteinase and Peptidase Activity
in Solid Tumor Transplants.
Acta Radiol.Suppl. 154, 1 (1957)

- SYLVEN, B. and
BOIS, J. Studies on the Histochemical "Leucyl-Amino-
peptidase" Reaction (Identity of the Enzymes possibly Involved).
Histochemie 3, 65 (1962)
- TALALAY, P.;
FISHMAN, W.H. and
HUGGINS, C. Chromogenic Substrates. II. Phenolph-
thalein Glucuronic Acid as Substrate
for the Assay of β -Glucuronidase
Activity.
J.Biol.Chem. 166, 757 (1946)
- TALANTI, S. and
HOPSU, V.K. Leucinaminopeptidase in the Mammary
Gland of Cow and Rat.
Nature 191, 86 (1961)
- TUPPER, R.;
WATTS, R.W.E. and
WORMELL, A. Some Observations on the Zinc in Car-
bonic Anhydrase.
Biochem.J. 50, 429 (1952)
- VEIBEL, S. Hydrolysis of Galactosides, Mannosi-
des and Thioglycosides.
The Enzymes I, 1, 621 (1950)
- WACHSTEIN, M. Histochemical Staining Reactions of
the Normally Functioning and Abnormal
Kidney.
J.Histochem.Cytochem. 3, 246 (1955)
Histochemistry of Enzymes in Tumors.
Handb.d.Histochemie VII, 2, 73 (1962)
- WALDSCHMIDT-LEITZ, E. Zur Frage der Existenz einer Leucyl-
und KELLER, L. Peptidase.
Z.physiol.Chem. 309, 228 (1957)
- WALLENFELS, K. und
BERNT, E. Über die gruppenübertragende Wirkung
von disaccharidspaltenden Enzymen.
Angew.Chem. 64, 28 (1952)
- WALLENFELS, K.;
ZARNITZ, M.L.;
LANLE, G.;
BENDER, H. und
KESER, M. Untersuchungen über milchzuckerspalt-
tende Enzyme III. Reinigung, Kristalli-
sation und Eigenschaften der β -Galac-
tosidase von Escherichia coli.Ml 309.
Biochem.Z. 331, 459 (1959)
- WATTENBERG, L.W. Histochemical Study of Amino-peptidase
in Metaplasia and Carcinoma of Sto-
mach.
Arch.Path. 67, 281 (1959)
- WATZKA, M. Handbuch der Mikroskopischen Anatomie
des Menschen. V.Möllendorff, W. und
Bargmann, W.
7.Band:Harn- und Geschlechtsapparat.
Springer-Verlag, Berlin, Göttingen,
Heidelberg (1957)

- WEIDENHAGEN, R. Handbuch der Enzymologie. 512 (1940)
zit. nach HOFFMANN-OSTENHOF, O.
- WILLIGHAGEN, R.G.J. and Amino-peptidase Activity in Cancer
PLANTEYDT, H.T. Cells. Nature 183, 263 (1959)
- WILLSTÄTTER, R. und Zur enzymatischen Methodik
ROHDEWALD, M. Hoppe-Seyler's Zschr. für
physiol.Chemie 229, 241 (1934)
- WISTRAND, P.J. Carbonic Anhydrase in the Anterior
Uvea of Rabbit.
Acta physiol.scand. 24, 144 (1951)
- ZAMECNIK, P.C.; Peptidase Activity of Lymph and
STEPHENSON, M.L. and Serum after Burns.
COPE, O. J.Biol.Chem. 158, 135 (1945)
- ZANDER, J. Progesterone in Human Blood and
Tissues. Nature 174, 406 (1954)

L e b e n s l a u f

Am 20.4.1940 wurde ich, Gisela Hanko, als Tochter des Arztes Gustav Hanko und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Plath in Bielefeld geboren.

Von 1946-1950 besuchte ich die Volksschule in Ummeln, Krs. Bielefeld. Danach kam ich auf das neu-sprachliche Bavink-Gymnasium in Bielefeld. Dort bestand ich 1959 die Reifeprüfung.

Im Sommer-Semester 1959 begann ich in Tübingen das Medizin-Studium. Nach 2 Semestern legte ich das Vorphysikum ab. Anschließend studierte ich 3 Semester in Heidelberg und bestand dort 1961 das Physikum. Nach dem 1.klinischen Semester in München kam ich nach Tübingen zurück. Im 4.klinischen Semester konnte ich in Zürich studieren. Seit dem Winter-Semester 1963/64 war ich wieder in Tübingen immatrikuliert und bestand im Dezember 1964 die ärztliche Prüfung.

Fotodruck Frau Elly HUTH Tübingen